

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Rolle eosinophiler Granulozyten in der
Infarktheilung und im kardialen Remodeling
nach einem akuten Myokardinfarkt

von Niklas Bürgener

aus Adenau

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des
Klinikums der Universität München in Großhadern

Mentor: Univ.-Prof. Dr. Steffen Massberg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhalt

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Koronare Herzkrankheit und Atherosklerose	2
2.	Akuter Myokardinfarkt.....	2
2.1.	Pathogenese.....	2
2.2.	Einteilung	3
2.3.	Symptome.....	3
2.4.	Diagnose.....	4
2.5.	Therapie.....	4
3.	Der zeitliche Verlauf der Infarktheilung	6
4.	Kardiales Remodeling.....	8
5.	Zellen des angeborenen Immunsystems in der Infarktheilung.....	11
5.1.	Neutrophile Granulozyten	11
5.2.	Monozyten.....	12
5.3.	Makrophagen.....	14
6.	Eosinophile Granulozyten	16
6.1.	Aufbau und Differenzierung	16
6.2.	Funktionen in Physiologie und Pathologie.....	19
6.3.	Kardiale Manifestation von Hypereosinophilie	25
6.4.	Eosinophile in kardiovaskulären Erkrankungen	27
III.	ZIELSETZUNG	32
IV.	MATERIAL UND METHODEN	33
1.	Versuchsaufbau	33
2.	Versuchstiere	34
2.1.	Übersicht der verwendeten Mauslinien.....	35
2.2.	Tierhaltung, Zucht und Hygiene	36
3.	Operation	37
3.1.	Narkose.....	37
3.2.	Intubation	39

3.3.	Ischämie-Reperfusionsmodell	40
4.	Positron-Emissions-Tomographie (PET)	41
4.1.	Prinzip der Positron-Emissions-Tomographie	41
4.2.	Durchführung	41
4.3.	Auswertung	42
4.4.	Infarktgröße/ Totales Perfusionsdefekt (TPD)	42
4.5.	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)	42
4.6.	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV)	43
4.7.	Linksventrikuläres metabolisches Volumen (LVMV)	43
5.	Probennahme für Histologie und Durchflusszytometrie	43
5.1.	Kardiale Blutgewinnung	43
5.2.	Entnahme und Verarbeitung der Herzen	44
6.	Histologie	44
6.1.	Anfertigung der Gefrierschnitte	44
6.2.	Prinzip der Immunfluoreszenz	45
6.3.	Durchführung	45
6.4.	Auswahl der Antikörper	46
6.5.	Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	48
6.6.	Auswertung	49
7.	Zytokinarray	50
7.1.	Prinzip	50
7.2.	Durchführung	51
7.3.	Auswertung	52
8.	Durchflusszytometrische Untersuchungen (Fluorescence-activated cell scanning, FACS)	53
8.1.	Prinzip	53
8.2.	Übersicht verwendeter Antikörper	54
8.3.	Durchführung	55
8.4.	Auswertung	56
9.	In-vitro-Experimente	57
9.1.	Versuchsaufbau	57
9.2.	Isolation humaner eosinophiler Granulozyten	57
9.3.	Aktivierung eosinophiler Granulozyten	60

9.4.	Isolation humaner Monozyten.....	60
9.5.	Ausreifung isolierter Monozyten und Polarisierung zu M1/M2 Makrophagen.....	62
9.6.	FACS-Analyse	64
10.	IL-5/ Eotaxin-1 ELISA	65
10.1.	Prinzip	65
10.2.	Durchführung	65
10.3.	Auswertung	66
11.	Statistische Auswertung.....	66
V.	ERGEBNISSE	69
1.	Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und Gewebepersistenz nach Myokardinfarkt.....	69
2.	Schädigender Effekt eosinophiler Granulozyten im Rahmen des linksventrikulären Remodelings	71
2.1.	Totales Perfusionsdefizit/ Infarktgröße	71
2.2.	Linksventrikuläre Funktionsparameter	72
2.3.	Metabolisches Volumen	75
2.4.	Histologische Quantifizierung der Fibrosefläche.....	77
2.5.	Anzahl an CD68-positiven Zellen.....	78
2.6.	Kapillardichte im Periinfarktgebiet	80
2.7.	Zytokinarray	83
3.	Beeinflussung der Immunzellrekrutierung durch eosinophile Granulozyten	83
3.1.	FACS-Ergebnisse	83
3.2.	<i>In vitro</i> Experimente.....	91
3.3.	IL-5 ELISA	93
3.4.	Eotaxin-1 ELISA.....	94
VI.	DISKUSSION	96
1.	Diskussion des verwendeten Tiermodells.....	96
2.	Diskussion der verwendeten Methode.....	97
2.1.	OP-Methode	97
2.2.	Untersuchung der Infarktgröße und der ventrikulären Funktion	99

3.	Diskussion der Ergebnisse	100
3.1.	Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und Gewebepersistenz nach Myokardinfarkt.....	100
3.2.	Schädigender Effekt eosinophiler Granulozyten im Rahmen des linksventrikulären Remodelings.....	101
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	110
VIII.	SUMMARY.....	111
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	112
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	141
XI.	TABELLENVERZEICHNIS	143
XII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	144
XIII.	LEBENS LAUF	146
XIV.	DANKSAGUNG	147

I. EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen führen laut WHO Statistik mit weltweit knapp 18 Millionen Toten im Jahre 2016 die Liste der häufigsten Todesursachen an – fast ein Drittel aller Todesfälle weltweit. Davon macht allein die koronare Herzkrankheit knapp 9,5 Millionen aus. (1) Obwohl die Sterblichkeit in den Industrienationen in den letzten 30 Jahren dank besserer Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten deutlich zurückging, steigt die Prävalenz und Mortalität global gesehen an. So litten im Jahr 2015 weltweit 422 Millionen Menschen an einer Herzkreislauferkrankung. (2)

Bei einem akuten Myokardinfarkt (AMI) kommt es durch die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque zur Okklusion eines Koronargefäßes und dadurch zur Ischämie und Nekrose des zu versorgenden Myokards. Die Infarktheilung ist ein überaus komplexes Zusammenspiel aus Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Infolge eines Infarktes kommt es zu einer massiven Infiltration von Immunzellen, die nicht nur in der akuten Entzündungsphase, sondern auch im späteren Verlauf der Infarktheilung eine zentrale Rolle spielen (3). Die Bedeutung verschiedener Immunzellpopulationen wie die der Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten steht im Fokus aktueller Forschung (4-6). Die Rolle von eosinophilen Granulozyten wurde hingegen noch nicht ausreichend erforscht.

Eosinophile Granulozyten werden meist mit Asthma, allergischen Reaktionen und der Abwehr gegen Parasiten in Verbindung gebracht. Neuere Erkenntnisse haben jedoch gezeigt, dass sie in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle spielen; auch in kardiovaskulären Erkrankungen (7). Studien zeigen, dass Eosinophile an der Entstehung von Atherosklerose, Thrombose und bestimmter Formen der Myokarditis beteiligt sind (8, 9). So konnten Eosinophile histologisch in aspirierten koronaren Thromben und im Infarktgebiet nachgewiesen werden (10, 11). Klinische Studien zeigen außerdem eine Korrelation zwischen der Eosinophilenzahl und dem Auftreten von Komplikationen sowie dem Langzeitüberleben nach einem Herzinfarkt (12, 13).

All das weist auf eine potentielle Rolle der eosinophilen Granulozyten im akuten Infarktgeschehen und dessen Heilungsverlauf hin.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Koronare Herzkrankheit und Atherosklerose

Die koronare Herzkrankheit (KHK), auch ischämische Herzkrankheit genannt, ist die häufigste kardiovaskuläre Erkrankung und umfasst die stabile und instabile *Angina pectoris*, den akuten Myokardinfarkt und den plötzlichen Herztod. Sie beschreibt das Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf des Myokards und Sauerstoffversorgung durch die Koronararterien. Dieses Missverhältnis ist meist auf eine Lumenverengung einer oder mehrerer Koronararterien durch eine atherosklerotische Plaque zurückzuführen.

Die Atherosklerose, die häufigste Form der Arteriosklerose, ist ein chronischer, steriler Entzündungsprozess, bei dem es durch die endotheliale Dysfunktion einer Arterie zur Einlagerung und Oxidation von Cholesterinestern und Fettsäuren in der *Tunica intima* kommt. Im Rahmen dieser chronischen Entzündung kommt es durch ein komplexes Zusammenspiel von Gefäßendothelzellen, Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Plättchen zu einer progredienten Degeneration der Gefäßwand und so zur Bildung eines Atheroms, das das Gefäßlumen nach und nach okkludiert. Ein solches Atherom besteht aus einem mit Cholesterin, Fettsäuren, Kollagen und Entzündungszellen gefüllten Kern und einer fibrösen Kappe.

Risikofaktoren für die Atherosklerose sind Übergewicht, ein ungesunder Lebensstil, Tabakkonsum, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Bluthochdruck. (14)

2. Akuter Myokardinfarkt

Der Fokus der vorliegenden Doktorarbeit liegt auf dem Einfluss von eosinophilen Granulozyten und anderen angeborenen Immunzellen auf die kardialen Umbauvorgänge infolge eines akuten Myokardinfarkts. Daher soll auf die klinischen Aspekte im Folgenden nur kurz eingegangen werden.

2.1. Pathogenese

Zu einem akuten Myokardinfarkt kommt es meist durch die Ruptur, Erosion, Ulzeration oder Dissektion einer instabilen atherosklerotischen Plaque in einer

Koronararterie. Dadurch kommt das zirkulierende Blut in Kontakt mit dem thrombogenen Kern der Plaque, wodurch sich ein Thrombus bildet. Dieser verlegt das Gefäßlumen zusätzlich und führt zu einer Ischämie im zu versorgenden Gebiet.

Die Ischämie führt zu einer Nekrose des Herzmuskelgewebes. Abhängig von der Dauer und Lokalisation der Okklusion und damit der Größe des minderperfundierten Gebietes gestaltet sich die klinische Erscheinung des Patienten.

Seltener kann es auch unabhängig von atherosklerotischen Prozessen zu einem Myokardinfarkt kommen, beispielsweise durch den Spasmus einer Koronararterie, durch eine koronare Embolie, eine Myokarditis, Arrhythmien, Anämie sowie eine Hyper- oder Hypotension (15).

2.2. Einteilung

Anhand der elektrokardiographischen Befunde teilt man einen Infarkt in STEMI (*ST-elevation myocardial infarction*, ST-Hebungsinfarkt) oder NSTEMI (*non ST-elevation myocardial infarction*, Nicht-ST-Hebungsinfarkt) ein. Ein STEMI zeigt sich meist bei einer vollständigen Okklusion der Koronararterie, während sich ein NSTEMI bei einer partiellen Okklusion bzw. beim Vorhandensein von Kollateralgefäßen manifestiert.

Die EKG-Morphologie kann Auskunft über das Alter des Infarkts (akut, subakut oder alter Infarkt) und das Ausmaß der Wanddurchdringung (transmural oder subendokardial) geben. Ebenso kann in manchen Fällen das betroffene Gefäß und damit die Lokalisation (septal, anterior, lateral oder posterior) bestimmt werden.

2.3. Symptome

Die klassische Symptomatik eines akuten Myokardinfarkts umfasst den retrosternalen Schmerz in der Brust, ausstrahlend in Arme, Oberbauch und Kiefer und ein generelles Unwohlsein, das länger als 20 Minuten anhält, meist nicht zu lokalisieren und nicht positions- oder bewegungsabhängig ist. Oft werden die Schmerzen begleitet von eher unspezifischen Symptomen wie Schwitzen, Dyspnoe, Benommenheit oder Synkopen, die ebenso respiratorische, gastrointestinale, neurologische oder andere Ursachen haben können. (16)

2.4. Diagnose

Eine Task Force der European Society of Cardiology (ESC), der American College of Cardiology Foundation (ACCF), der American Heart Association (AHA) und der World Heart Federation (WHF) hat 2007 einen Konsens zur universellen Definition eines Myokardinfarktes veröffentlicht, die neben den klassischen Kriterien, Klinik, EKG- und Enzymveränderungen, auch neuere Diagnostika wie sensitivere und spezifische Biomarker und Bildgebungsverfahren berücksichtigt. Demnach sollte dann von einem Myokardinfarkt gesprochen werden, wenn ein Anstieg und/oder Abfall einer der kardialen Biomarker Troponin I oder Troponin T detektiert wird und zusätzlich mindestens eines der folgenden, für eine myokardiale Ischämie sprechende, Kriterien zutrifft:

- länger als 20 Minuten andauernde Symptome einer Ischämie wie Schmerzen in Brust, oberen Extremitäten, Oberbauch, Kiefer; begleitet von Müdigkeit Dyspnoe oder Synkopen
- EKG-Veränderungen in Form einer ST-Strecken-Hebung oder eines Linksschenkelblocks
- EKG-Veränderung in Form von pathologischen Q-Wellen
- bildgebender Nachweis einer myokardialen Nekrose, Abnormalitäten in der Kontraktilität oder des Vorhandenseins eines intrakoronaren Thrombus

Ein Herzinfarkt ist ein medizinischer Notfall, denn je länger die Dauer der Minderperfusion, desto größer der irreversible Schaden und desto schlechter das Langzeitüberleben des Patienten. Bei einem klinischen Verdacht sollte ein Patient sofort in eine Notaufnahme eingeliefert werden. Dort wird ein EKG geschrieben und das Blut auf kardiales Troponin und andere Biomarker untersucht. (16)

Basierend auf diesen Ergebnissen wird der Patient in ST-Hebungsinfarkt, Nicht-ST-Hebungsinfarkt, instabile *Angina pectoris* oder nicht Ischämie-bedingten Brustschmerz eingeteilt. (17)

2.5. Therapie

Bestätigt sich der Verdacht eines ST-Hebungsinfarkts wird der Patient, wenn nötig, mit Sauerstoff versorgt und die Bewegung minimiert, um den kardialen Sauerstoffverbrauch so gering wie möglich zu halten. Das oberste Ziel ist es, die Blutversorgung im Ischämiegebiet so schnell wie möglich wiederherzustellen, um

das weitere Absterben von Myokardgewebe zu verhindern. Abhängig von Infarktgröße, Zeitpunkt der Vorstellung, Gesundheitszustand und Blutungsrisiko, erhält der Patient eine individuell angepasste pharmakologische und gegebenenfalls invasive Therapie in Form einer perkutanen Koronarintervention (PCI) oder Bypassoperation.

Die medikamentöse Therapie besteht aus Antikoagulation (Heparin, Thrombininhibitoren, Faktor Xa-Inhibitoren), Thrombozytenaggregationshemmung (ASS, P2Y₁₂ Rezeptor-Inhibitoren, Glykoprotein IIb/IIIa Inhibitoren), Analgesie (Morphium) sowie Vasodilatation und Vorlastsenkung (Nitrate) (18). Zusätzlich können Betablocker zur Senkung der Herzfrequenz und des Blutdrucks eingesetzt werden, die dadurch das Risiko einer Myokardruptur und einer malignen ventrikulären Tachyarrhythmie senken. Außerdem wird die Behandlung mit cholesterinsenkenden Statinen begonnen, die zusätzlich antiinflammatorische, antithrombotische und antioxidative Eigenschaften haben (19).

Mittels Koronarangiographie wird die Verengung dargestellt und entschieden, ob die Engstelle mit einer Ballondilatation oder herzchirurgisch behoben werden kann. Im Falle einer PCI wird ein Katheter mit einem Ballon über einen Führungsdraht bis zur Okklusion geschoben und der atherosklerotisch verengte Abschnitt durch Aufblasen des Ballons mechanisch geweitet. Meist wird die dilatierte Stelle mithilfe eines Stents zusätzlich gestützt, um eine erneute Okklusion zu vermeiden. (20)

Die medikamentöse Langzeittherapie umfasst meist ASS (21), Betablocker (22) zur Senkung der Herzfrequenz und Statine (23) zur Senkung des Blutholesterols. Bei einer anhaltenden Verschlechterung der linksventrikulären Ejektionsfraktion oder einem frühen Herzversagen ist die Gabe von ACE-Hemmern zur Senkung des Blutdrucks empfohlen (24, 25).

Insgesamt ist jedoch zu betonen, dass keine der Therapieformen kurativ ist. Denn Herzmuskelgewebe, das einmal abgestorben ist, kann nicht regenerieren, sondern nur durch eine bindegewebige Narbe ersetzt werden. Die initiale Therapie hat zum Ziel, die Gefäßokklusion möglichst schnell zu beheben, um die Blutversorgung wiederherzustellen und so das Nekroseareal so klein wie möglich zu halten. Die Langzeittherapie zielt darauf ab, einen Reinfarkt zu verhindern, sowie den maladaptiven Mechanismen und dem daraus entstehenden Herzversagen

entgegenzuwirken. Aktuelle Forschung mit dem Ziel der myokardialen Regeneration basierend auf Stammzellen oder kardialen Vorläuferzellen (26) sowie auf bestimmten Agentien oder Methoden (27), konnte bisher nicht den erwünschten klinischen Effekt zeigen.

3. Der zeitliche Verlauf der Infarktheilung

Die Infarktheilung ist ein überaus komplexer Vorgang, in dem Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, einwandernde und residente Immunzellen sowie die extrazelluläre Matrix miteinander interagieren (s. Abbildung 1). Sie lässt sich anhand der Zellkomposition und des vorherrschenden Mikromilieus in vier ineinander übergehende Phasen einteilen:

Je nach Quelle und Spezies unterscheidet sich die Dauer der einzelnen Phasen. Die Akutphase in den ersten 24 Stunden nach Infarkt, die inflammatorische Phase von Tag 1 bis Tag 6 nach Infarkt, die Proliferationsphase von Tag 6 bis Tag 14 und die Ausreifungsphase von 2 Wochen nach Infarkt bis zu 12 Monaten bis die Wunde vollständig ausgeheilt ist.

Der Verschluss der Koronararterie führt zu einer Minderperfusion im distalen Versorgungsgebiet und so zum Ischämie-bedingten Zelltod von Kardiomyozyten innerhalb von Stunden – der Beginn der Akutphase. Der Untergang des Myokards führt zur Ausschüttung sogenannter *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), *reactive oxygen species* (ROS), proinflammatorischer Zytokine und anderer Alarmsignale. Dadurch werden Neutrophile aus Knochenmark und Milz mobilisiert, die das Ischämiegebiet infiltrieren. Sie sezernieren proteolytische Enzyme, ROS, die einen zusätzlichen Gewebeschaden verursachen, und Chemokine, durch die Monozyten angelockt werden (28, 29).

Die Rekanalisierung des okkludierten Gefäßes stellt die Sauerstoff- und Energieversorgung wieder her, wodurch auf lange Sicht Myokard gerettet werden kann. Paradoxerweise führt die Reperfusion auf kurze Sicht jedoch zu einem plötzlichen Anstieg an oxidativem Stress und dadurch zu einem zusätzlichen Absterben von Kardiomyozyten. Dieses Phänomen nennt man Ischämie-Reperfusionsschaden.

Die inflammatorische Phase ist gekennzeichnet durch das Einwandern proinflammatorischer Monozyten (Ly6C^{hi}) und die Aktivierung residenter

Makrophagen. Diese setzen entsprechende Mediatoren frei und beginnen, den Zelldebris abzuräumen. Die so entstehende sterile Entzündung dient als Trigger für die Zellproliferation, stabilisiert die Herzwand und verhindert so eine Ruptur ebendieser. Gleichzeitig werden Fibroblasten aktiviert, die ebenso pro-inflammatorische Signalwege aktivieren und gemeinsam mit anderen Zellen eine temporäre Fibrinmatrix bilden, um die toten Zellen zu ersetzen. Darüber hinaus sezernieren sie Matrixmetalloproteinasen, proteolytische Enzyme, die die extrazelluläre Matrix (ECM) aufspalten und somit einen wichtigen Einfluss auf (die Umbauvorgängen im Heilungsprozess haben.

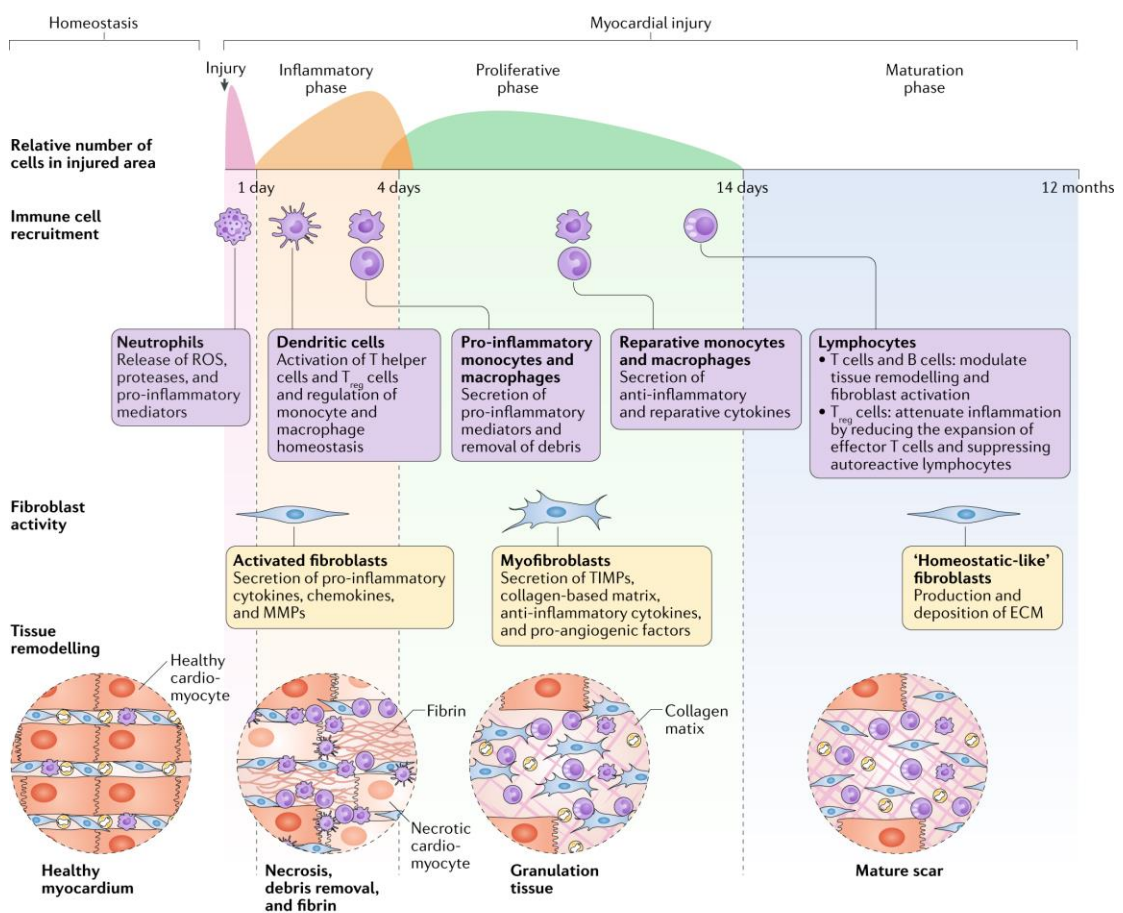


Abbildung 1: Phasen der Infarktheilung

Darstellung der Phasen der Infarktheilung mit relativer Anzahl, Art und Funktion der infiltrierenden Immunzellen, Eigenschaften der Fibroblasten und Aufbau der Infarktnarbe im Heilungsverlauf

Die Phasen der Infarktheilung werden von unterschiedlichen Immunzellpopulationen geprägt. Phänotyp und Funktionen der Entzündungszellen sind stark vom vorherrschenden Mikromilieu abhängig.

ECM = extrazelluläre Matrix, MMP = Matrixmetalloproteinasen, ROS = reactive oxygen species, TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases, T_{reg} = regulatorische T-Zellen

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Inc., Springer Nature, Copyright © 2018 (37)

Die ECM besteht aus einer Reihe von Strukturproteinen wie fibrillärem Kollagen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen. Sie dient als strukturgebendes Bindeglied zwischen den Herzmuskelzellen (30). Neuere Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass die ECM darüber hinaus über komplexe biologische Fähigkeiten verfügt, wie die Beeinflussung der Zellproliferation, -migration, -differenzierung, und Zellkommunikation (31, 32). (33)

Die darauffolgende Proliferationsphase wird eingeleitet durch die Apoptose der neutrophilen Granulozyten. In dieser Phase dominieren einwandernde oder residente, reparative Monozyten (Ly6C^{lo}), die sich entsprechend des vorherrschenden Mikromilieus zu M_2 -Makrophagen differenzieren (34, 35). Gemeinsam mit regulatorischen Lymphozyten (T_{reg}) drosseln sie durch Sekretion von $\text{TGF-}\beta$ und IL-10 die inflammatorischen Signalwege und schaffen ein proliferatives Milieu (36). Dadurch differenzieren sich Fibroblasten zu Myofibroblasten, die die Degradation der ECM durch Sekretion von Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen (TIMPs) inhibieren und Kollagen synthetisieren. So wird die primäre Fibrinmatrix durch eine Kollagenmatrix ersetzt. Ebenso werden Gefäßendothelzellen zur Proliferation angeregt, wodurch die ersten Gefäße in das entstehende Granulationsgewebe einsprießen. (32, 37)

In der Reifungsphase wird das Granulationsgewebe nach und nach in eine zellarme, bindegewebige Narbe umgewandelt, die aus einem dichten Kollagennetzwerk, Fibroblasten und Immunzellen besteht (37). Die entstandene Narbe ist ein metabolisch dynamisches Gewebe, das neben mechanischen und strukturellen auch elektrophysiologische und metabolische Aufgaben übernimmt (38).

4. Kardiales Remodeling

Das kardiale Remodeling ist ein physiologischer Anpassungsprozess an die veränderten Druckverhältnisse nach einem Infarkt, der nach und nach in eine pathologische Maladaptation umschlägt. Es stellt eine der Hauptursachen für ein Herzversagen dar (39).

Auf den plötzlichen Verlust von Myokard reagiert der Organismus sowohl mit systemischen als auch lokalen Kompensationsmechanismen, die versuchen die

strukturelle Integrität aufrechtzuerhalten und die verminderte Pumpleistung des Herzens auszugleichen (s. Abbildung 2). Die Remodelingvorgänge beschränken sich nicht nur auf den Infarktbereich, sondern auch den Übergangsbereich, die sogenannte *border zone*, sowie das nicht infarzierte Myokard, die *remote zone*.

In der Akutphase des kardialen Remodelings kommt es zur Infarktexpansion, um den Raum der untergegangenen Herzmuskelzellen zu füllen und die Kontraktilität aufrechtzuerhalten (40). Das Auseinanderschere der Kardiomyozyten geschieht durch Degradation der interzellulären Kollagenvernetzungen durch Serinproteasen und Matrixmetalloproteinasen, sezerniert von Neutrophilen (41, 42). Dadurch kommt es zu einer Ausdünnung der Kammerwand und zur Dilatation des Ventrikels. Dies führt zu einem Anstieg im systolischen und diastolischen Wandstress.

Kardiomyozyten sind vollständig ausdifferenzierte Zellen. Aktuelle Forschung hat zwar gezeigt, dass sie in einem sehr geringen Ausmaß über die Fähigkeit der Proliferation und Zellerneuerung verfügen, jedoch reicht diese nicht aus, um die untergegangenen Zellen zu ersetzen (43). Daher besteht ihre einzige Möglichkeit, sich an gestiegene Belastungsverhältnisse anzupassen, in der Hypertrophie. Der Anstieg im Wandstress wird von Mechanorezeptoren detektiert und führt zur Ausschüttung von Norepinephrin, Angiotensin und Endothelin. Dies triggert die Synthese kontraktile Einheiten und damit die Hypertrophie der Kardiomyozyten. (44)

Gleichzeitig wird durch die verringerte Auswurfleistung des linken Ventrikels das neurohumorale System aktiviert. Die Ausschüttung von Catecholaminen aus dem Nebennierenmark führt lokal zu einer Verstärkung der Hypertrophie (45) und systemisch zu einer Vasokonstriktion. Gemeinsam mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) kann so der Blutdruck vorübergehend aufrechterhalten werden. Dieser Adaptationsmechanismus führt jedoch auf lange Sicht zu einer Volumenüberladung und dadurch zu mehr mechanischem Stress. Auf diesen Stress reagiert das Herz mit weiterer Hypertrophie und Dilatation, was zu einer progressiven Verschlechterung der linksventrikulären Funktion führt (46). So entsteht eine Art Teufelskreis, der unbehandelt im Herzversagen endet.

Im späteren Verlauf des kardialen Remodelings steht die Fibrose im Vordergrund. Man unterscheidet zwischen reparativer und reaktiver Fibrose. Die reparative Fibrose ist letztlich die Narbenbildung im Nekrosegebiet mit dem Ziel, die untergegangenen Herzmuskelzellen zu ersetzen und die Kammerwand zu stabilisieren. Die reaktive Fibrose hingegen ist eine Maladaptation im *remote* Areal des Herzens als Reaktion auf die veränderten Druckverhältnisse. Ähnliche Anpassungsprozesse geschehen auch im normalen Alterungsprozess des Herzens (47). Während die Fibrose im Infarktgebiet unabdingbar ist für die strukturelle Integrität, kommt es in der *remote zone* zu interstitieller und perivaskulärer Kollagenablagerung, die wiederum einen negativen Einfluss auf die Herzfunktion hat (48). Die überschießende Ablagerung extrazellulärer Matrix

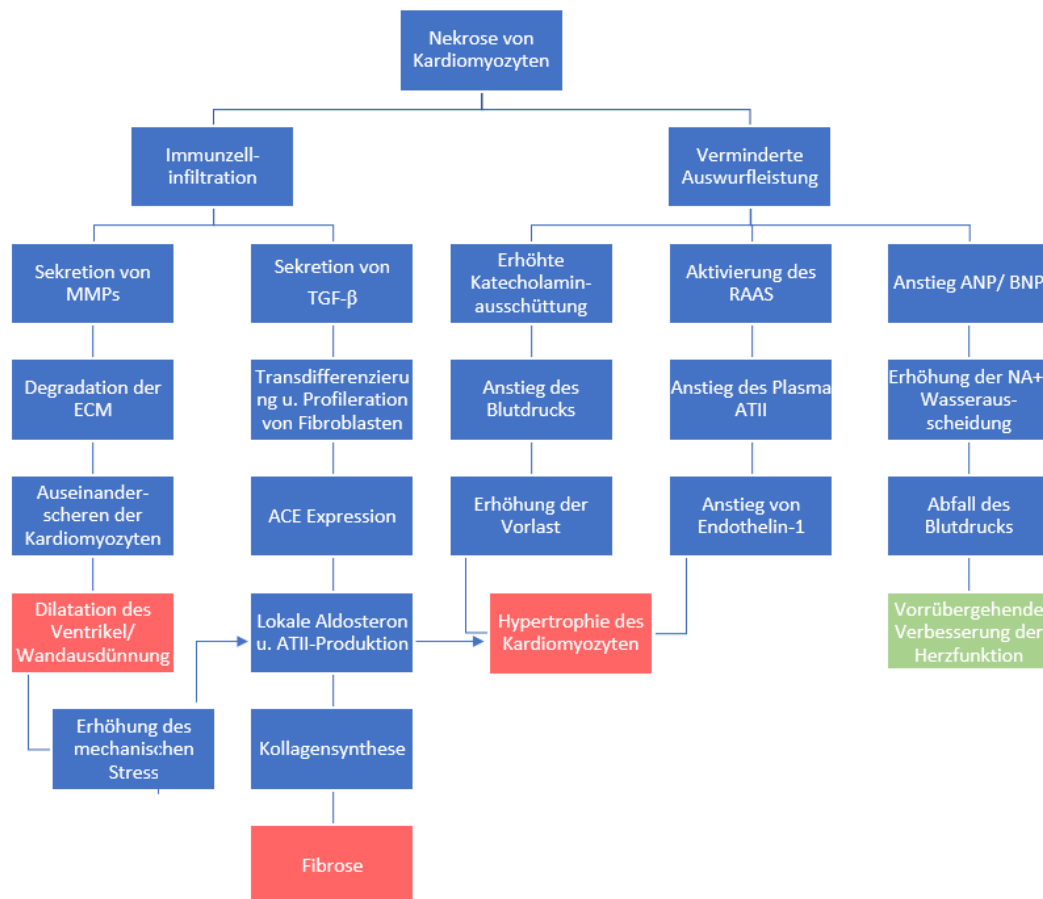


Abbildung 2: Lokale und systemische Anpassungsvorgänge infolge eines Myokardinfarkts

Der infarktbedingte Zelltod führt zu einer komplexen Kaskade an lokalen und systemischen Anpassungsvorgängen, in die eine Vielzahl von Zellen und Mediatoren involviert sind. Anfangs gelingt es durch diese Mechanismen, die veränderten Druckverhältnisse zu kompensieren. Doch auf lange Sicht führen sie zu maladaptiven Prozessen, die in eine Dilatation und Ausdünnung des Ventrikels, eine Hypertrophie der verbleibenden Kardiomyozyten, eine interstitielle Fibrose und einer verminderten Kontraktilität zur Folge haben.

ECM = extrazelluläre Matrix, RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ATII = Angiotension II, ANP = atriales natriuretisches Peptid, BNP = *brain* natriuretisches Peptid

Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc., Copyright © 2000 (modifiziert)

resultiert in einer Steifheit, einer kontraktilen Dysfunktion und Rhythmusstörungen (49). Außerdem verschlechtert die perivaskuläre Fibrose die Sauerstoffversorgung und somit auch die myokardiale Ischämie (50). (37)

Das Schlüsselzytokin der Fibrose ist der *transforming growth factor $\beta 1$* , kurz TGF- $\beta 1$. Er drosselt die Synthese inflammatorischer Zytokine und Chemokine in Makrophagen und Endothelzellen und fördert die Proliferation und Chemotaxis von Fibroblasten und Makrophagen. Ebenso triggert es die Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die die Kollagenmatrix synthetisieren (51). Die Kollagensynthese selbst wird durch verschiedene Faktoren gesteuert, darunter der mechanische Stress, das atriale natriuretische Peptid (ANP), Prostaglandin E2 (PGE2), Stickstoffmonoxid (NO), Plättchen- (PDGF) sowie Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) (52). (32)

Das Ausmaß des Remodelings korreliert grob mit der Infarktgröße. Große Infarkte führen zu einer größeren Dilatation, zu mehr interstitieller Fibrose und zu einem größeren Anstieg im systolischen und diastolischen Wandstress (53). Das enddiastolische Volumen (EDV) und die Ejektionsfraktion (EF) sind wichtige prognostische Faktoren für die Mortalität (54, 55).

5. Zellen des angeborenen Immunsystems in der Infarktheilung

Lange Zeit wurde angenommen, dass die angeborene Immunantwort den Ischämie-Reperfusionsschaden vergrößert und die maladaptiven Prozesse im späten Remodeling verstärkt (56). Die neuere Wahrnehmung schreibt den Zellen des angeborenen Immunsystems eher eine ambivalente Rolle in der Infarktheilung zu.

Auch unter physiologischen Bedingungen im gesunden Herzen, im Folgenden auch *steady state* genannt, residieren alle relevanten Immunzellpopulationen im Myokard. Interessanterweise enthält der Herzmuskel 12-mal so viele Leukozyten wie Skelettmuskulatur (57).

5.1. Neutrophile Granulozyten

Die ersten Zellen, die das Infarktgebiet infiltrieren sind neutrophile Granulozyten. Auch ihnen werden ambivalente Eigenschaften zugeschrieben: einerseits ist ihr Einstrom wichtig zur Initiation der sterilen Entzündung, für die Abräumvorgänge

im Nekrosegebiet und zur Chemotaxis weiterer Immunzellen, andererseits scheinen sie dem noch intakten Herzgewebe im Übergangsgebiet zu schaden. So zeigen Studien, dass die Depletion von Neutrophilen in verschiedenen Tiermodellen zu einer Reduktion der Infarktgröße führt (5, 58). Ebenso führen Maßnahmen zur Reduktion der Neutrophileninfiltration wie eine Blockade des Komplementsystems (59), der ROS (60) oder CXCR-2 Chemokinen (61) zu einer Reduktion der Infarktgröße (62). Entgegengesetzt dazu wird ihnen eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung proinflammatorischer Monozyten und der Polarisierung von Makrophagen zugeschrieben, die unerlässlich für eine geordnete Infarktheilung sind (29, 63). Diese Studien zeigen, dass es durch die Depletion von Neutrophilen zu einer Verstärkung der maladaptiven Prozesse kommen kann, was wiederum im Herzversagen mündet. (37)

5.2. Monozyten

Monozyten gehören zum mononukleären Phagozytose System (MPS), werden im Knochenmark produziert und betreten den Blutkreislauf in einem CCR2-abhängigen Mechanismus. CCR2 ist der Chemokin-Rezeptor für CCL2 (oder MCP1, *Monocyte chemoattractant protein-1*) und ist hauptverantwortlich für die Transmigration und Infiltration von Monozyten (64). Im Blutkreislauf zirkulieren Monozyten frei oder patrouillieren an Gefäßwänden und differenzieren sich im Gewebe zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. Nahrendorf *et al.* konnten zeigen, dass Monozyten schon im undifferenzierten Zustand und nicht erst als Makrophagen eine aktive Rolle in der Infarktheilung einzunehmen scheinen (34). Sie infiltrieren das verletzte Myokard ab Tag 1, bleiben bis Tag 7 auf einem hohen Level, fallen dann langsam ab, bis sie nach Tag 16 wieder vergleichbare Werte wie im *steady state* erreichen.

Im Laufe der Infarktheilung kann im murinen Herzen zwischen zwei in ihrer Funktion kontroversen, zeitlich versetzt auftretenden Monozytenpopulationen unterschieden werden: auf der einen Seite die inflammatorischen Ly-6C^{hi}CCR2⁺CX₃CR1^{low}- und auf der anderen Seite die residenten Ly-6C^{lo}CCR2⁻CX₃CR1^{hi}-Monozyten (s. Abbildung 3). Erstere sind mit den humanen klassischen CD14^{hi}CD16⁻-Monozyten zu vergleichen, letztere mit den humanen nicht-klassischen CD14^{lo}CD16⁺-Monozyten. Diese biphasische Infiltration lässt sich auch in humanen Patienten darstellen (65, 66).

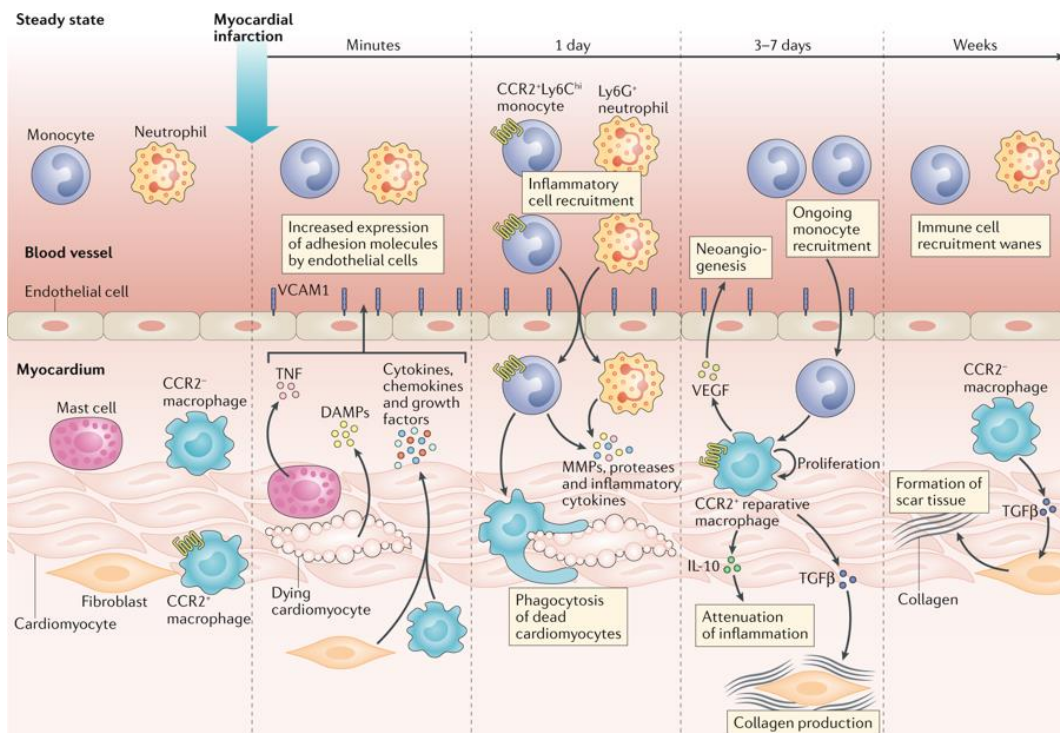


Abbildung 3: Funktion von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten im Verlauf der Infarktheilung

Im gesunden Herzen residieren vor allem CCR2-Makrophagen. Durch das Ischämie-bedingte Absterben von Kardiomyozyten kommt es zur Ausschüttung von DAMPs, TNF, Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die zu einem massiven Einstrom von Neutrophilen und CCR2⁺Ly6Chi-Monozyten führen. Diese verstärken das inflammatorische Signal durch die Ausschüttung entsprechender Zytokine, reifen zu Makrophagen aus und phagozytieren die toten Zellen. In der proliferativen Phase kommt es zu einer Änderung des Mikromilieus. Durch die Sekretion von IL-10 und TGF-β schwächen reparative Makrophagen die Entzündung ab und fördern die Kollagenproduktion. In der Reifungsphase weisen die Makrophagen wieder einen CCR2-Phänotyp auf.

CCR2 = CC-Chemokin Rezeptor 2, CCL2 = CC-Chemokin-Ligand 2, TNF = Tumornekrosefaktor, MMP = Matrixmetalloproteinase, TGFβ = *Transforming growth Factor* β, VEGF = *Vascular Endothelial Growth Factor*, IL-10 = Interleukin 10, DAMP = *danger-associated molecular pattern*

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Inc., Springer Nature, Copyright © 2018 (73)

Die Ly-6C^{hi}-Monozyten dominieren in der frühen Phase der Entzündung, wo ihre Aufgabe in der Phagozytose des Zelldebris liegt. Sie sezernieren proinflammatorische Mediatoren wie TNF-α, IL-1β und die Myeloperoxidase sowie proteolytische Enzyme wie MMP3, MMP9 und MMP13. Die residenten Ly-6C^{lo}-Monozyten spielen eher in der Heilungsphase eine Rolle. Durch Sekretion entsprechender Zytokine (IL-10, TGF-β, IL-10) schaffen sie ein proliferatives Milieu und schwächen die Entzündungsreaktion ab. Durch Sekretion von TGF-β fördern sie die Proliferation und Differenzierung von Myofibroblasten sowie die Synthese und Ablagerung von Kollagen. Durch Sekretion des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) fördern sie die Neoangiogenese im entstehenden Granulationsgewebe. Die zeitliche Depletion

der jeweiligen Monozytenpopulation mit Clodronate-Liposomen konnte die jeweilige Funktion bestätigen. (4, 34, 62)

Ein CCR2-Knockout zur Depletion der einwandernden inflammatorischen Monozyten führte zu einer Reduktion der Fibrose, jedoch ohne Einfluss auf die kardiale Hypertrophie (67).

5.3. Makrophagen

Sowohl im gesunden als auch im kranken Herzgewebe stellen Makrophagen eine sehr heterogene Population dar. Unter physiologischen Bedingungen können im Herzen mindestens vier Makrophagen-Subpopulationen anhand ihrer CCR2-, MHC II- und Ly6C-Oberflächenmarker unterschieden werden. Die CCR2⁻ Makrophagen lassen sich in eine MHC II⁺- und eine MHC II⁻-Subpopulation unterteilen, die den Großteil der residenten Makrophagen ausmachen. Daneben gibt es noch eine kleine CCR2⁺MHC II⁺- und eine Ly6C⁺-Population (68, 69).

Aktuelle Studien führten zu einem Paradigmenwechsel in der Wahrnehmung der Herkunft residenter Makrophagen. *Fate mapping* Studien haben gezeigt, dass die zahlenmäßig dominierenden CCR2⁻-Makrophagen sowie die Ly6C⁺-Subpopulation im Herzen ihren Ursprung im Dottersack und aus fetalen Leberovollwuchsellen haben. Ihre Aufrechterhaltung geschieht weniger durch das Einwandern von Monozyten als vielmehr über lokale Proliferation (70). Nur die CCR2⁺-Makrophagen entspringen dem Monozytenpool (71-73). Die residente Population weist im *steady-state* einen M2-Phänotyp auf (74). Bajpai *et al.* konnten erst kürzlich zeigen, dass es im menschlichen Herzen vergleichbare Subpopulationen von Makrophagen mit unterschiedlicher Herkunft und Funktion gibt (6).

Im Myokardinfarkt-Modell konnten Heidt *et al.* mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen zeigen, dass inflammatorische Monozyten das Infarktgebiet infiltrieren und in der inflammatorischen Phase dominieren, während die residenten CCR2⁻-Makrophagen nach einem Tag verschwunden sind. Die einwandernden Monozyten differenzieren sich zu CCR2⁺-Makrophagen, die einen M1-Phänotyp aufweisen. Im Laufe der Infarktheilung verlieren die Monozyten ihre Bedeutung als Ursprung bis im ausgeheilten Infarkt die Aufrechterhaltung der Zellpopulation wieder vollständig über lokale Proliferation funktioniert (75). (76)

Generell polarisieren sich Makrophagen abhängig vom Mikromilieu (77). Stark vereinfacht lassen sie sich anhand ihres Verhaltens *in vitro* und ihrer Funktion in zwei Phänotypen unterteilen (78): Die klassische aktivierten M1-Makrophagen wirken proinflammatorisch. Sie entstehen als Reaktion auf proinflammatorische Stimuli wie LPS, TNF- α oder Interferon- γ . M2-Makrophagen, auch alternativ aktivierte Makrophagen genannt, hingegen sind eher in regenerativen Prozessen vorzufinden und zeigen anti-inflammatorische, proliferative Eigenschaften. Sie stimulieren die Zellproliferation, sezernieren Wachstumsfaktoren und weisen eine hohe Phagozytoseaktivität auf. Makrophagen polarisieren sich in Richtung M2 als Reaktion auf Gewebsdebris und anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-13 und TGF- β . (79, 80)

Im Verlauf der Infarktheilung weisen Makrophagen parallel zu Monozyten verschiedene Phänotypen auf: durchflusszytometrische Untersuchungen zeigen, dass anfangs der proinflammatorische M1-Phänotyp, hervorgegangen aus dem Monozyten-Pool (CCR2⁺), zu dominieren scheint, wohingegen im späteren Verlauf der regenerative M2-Phänotyp aus residenten Makrophagen (CCR2⁻) überwiegt. Auch die Untersuchung der Genexpression mittels qPCR zeigt, dass die Makrophagen in der frühen Phase proinflammatorische Zytokine (IL-6, IL-1 β , NOS2, IL-12a) und Rezeptoren (TLR4, TLR6, CCR2, CCR7) exprimieren, während die Makrophagen im späteren Verlauf antiinflammatorische Zytokine, besonders IL-10 exprimieren. Diese kontrastiven Genprofile erklären die gegensätzlichen Funktionen der Makrophagen in der Infarktheilung. (3, 81)

Die Ergebnisse aus Depletionsversuchen hängen folglich stark davon, wann und welche der Makrophagenpopulationen depletiert wurden. So zog eine vollständige Depletion der Makrophagen eine verschlechterte Infarktheilung nach sich (82). Eine selektive Depletion der M2-Makrophagen (CCR2⁻) führte zu einer schlechteren Infarktheilung und einem vermehrten Auftreten von kardialen Rupturen (83). Im Gegensatz dazu zeigte eine Depletion der M1-Makrophagen durch Blockade des CCR2-abhängigen Monozyteneinstroms einen kardioprotektiven Effekt (84). (70)

Die Beeinflussung des Makrophagen-Phänotyps stellt eine mögliche therapeutische Strategie dar. So führte eine Behandlung mit IL-4 im Mausmodell, die eine M2-Polarisierung induziert, zu einer verbesserten Herzfunktion und einer Reduktion der Infarktgröße (85).

Ob und welche Rolle eosinophile Granulozyten in der Infarktheilung und im kardialen Remodeling spielen, gilt es mit der vorliegenden Arbeit nachzuweisen. Im Folgenden werden grundlegende Informationen zu Aufbau, Funktion und Rolle der eosinophilen Granulozyten in kardiovaskulären Erkrankungen dargelegt.

6. Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten wurden schon Anfang des 19. Jahrhunderts von verschiedenen Wissenschaftlern beschrieben, erhielten aber erst 1879 von Paul Ehrlich ob ihrer acidophilen Färbeeigenschaften ihren bis heute gültigen Namen. Er spekulierte damals schon korrekt, dass es sich bei der eosinophilen Granula um Sekretionsprodukte handle und beschrieb verschiedene Ursachen für eine Eosinophilie, darunter Asthma, diverse Hauterkrankungen und parasitäre Infektionen (86).

6.1. Aufbau und Differenzierung

Eosinophile gehören zu den Leukozyten. Sie haben typischerweise einen doppelt gelappten Nucleus und einen Durchmesser von 10-16 µm. Sie unterscheiden sich von den anderen Granulozyten durch das Vorhandensein großer Mengen spezifischer sekundärer Granula, die sich eosinophil anfärben. Von besonderer Bedeutung sind die darin enthaltenen kationischen Proteine: das Major Basic Protein (MBP), das Eosinophile kationische Protein (ECP), die Eosinophile Peroxidase (EPX) und das Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN). Die primären Granula enthalten das Charcot-Leyden Christal Protein oder Galectin-10 (CLC/Gal10). Des Weiteren enthalten Eosinophile Lipidkörperchen, die durch ihre Produktion von Eicosanoiden (Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane) eine wichtige Rolle bei allergischem Asthma spielen (87). (88, 89)

Eosinophile enthalten über 35 Mediatoren (Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren) zur Regulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems (s. Abbildung 4). Sie exprimieren Th2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), Th1-Zytokine (IL-12, IFN- γ), proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) und immunsuppressive Zytokine (TGF- β und IL-10) (7).

Eosinophile besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren für Zytokine und Wachstumsfaktoren (IL-5, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-13, TGF- β) und Chemokine (CCL-11, CCR1, CCR3, CCL-5). Darüber hinaus zeigen sie Fc-Rezeptoren,

Adhäsions-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren zur Erkennung von Pathogenen. Außerdem verfügen sie über so genannte Pattern Recognition Rezeptoren: Rezeptoren für *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) regulieren die Immunantwort auf mikrobielle Pathogene, Rezeptoren für *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) auf wirtseigene Signale im Falle von Gewebeschädigung oder sterilen Entzündungen (90).

Eosinophile werden im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen gebildet. Diese differenzieren sich zu gemeinsamen CD34⁺-Vorläuferzellen mit basophilen Granulozyten aus und bilden dann eine separate Linie (91). Die Differenzierung von Eosinophilen wird über die Transkriptionsfaktoren GATA-binding protein 1 (GATA-1), PU.1 und das CCAAT-enhancing binding protein (c/EBP) reguliert (92). GATA-1, ein Zinkfinger-Protein, scheint hierbei die wichtigste Rolle zu spielen, da eine Deletion des GATA-1 Gens zu einer vollständigen Defizienz der eosinophilen Linie führt (93, 94).

Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-5 (IL-5) und der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) sind die wichtigsten Zytokine für die Entwicklung und Ausreifung von eosinophilen Granulozyten. IL-5 ist das Schlüsselzytokin der Biologie der Eosinophilen: es stimuliert die Proliferation, die Differenzierung und Ausreifung Eosinophiler sowie das Auswandern von

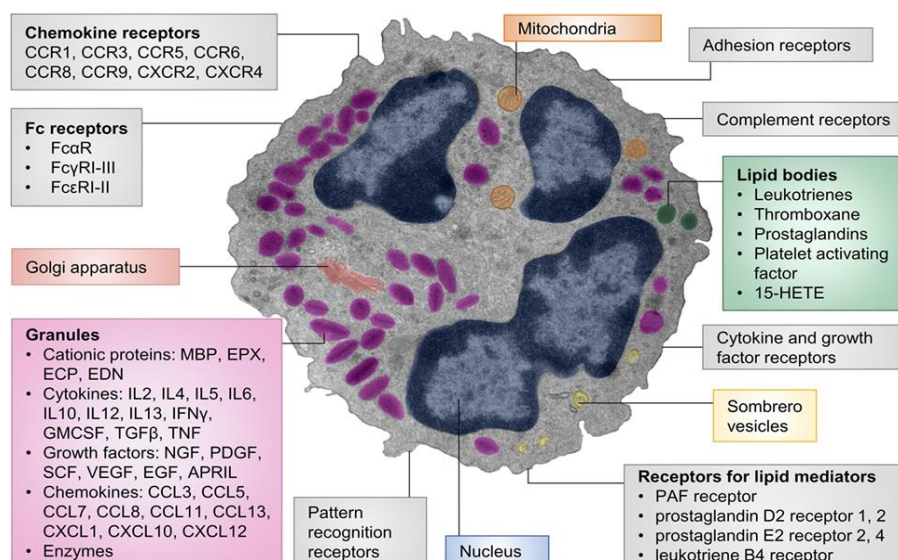


Abbildung 4: Aufbau eosinophiler Granulozyten

Eosinophile Granulozyten verfügen über eine Vielzahl an Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie Rezeptoren, über die sie mit anderen Zellen in physiologischen und pathologischen Prozessen interagieren können.

Mit freundlicher Genehmigung von Frontiers Media, Copyright © 2017 (89)

Eosinophilen aus dem Knochenmark ins Blut, das *Homing* und das Überleben im Gewebe (88). Letztere Funktionen sind synergistisch mit Eotaxin-1 (CCL11), Eotaxin-2 (CCL24) und RANTES (CCL5). Eotaxine sind für die Rekrutierung von Eosinophilen ins Gewebe verantwortlich. (95)

IL-5 ist nahezu Eosinophilen-spezifisch, das heißt der Rezeptor (IL-5R α) wird nur auf Eosinophilen, Basophilen und einer Unterart von Mastzellen exprimiert (92, 96). Synthetisiert wird IL-5 größtenteils von CD4⁺ Th2-Helferzellen als Immunantwort auf ein Pathogen oder Umweltagens (97). In solchen Zuständen wird es häufig mit den Zytokinen IL-4 und IL-13 ko-exprimiert, was zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, der Kontraktilität der glatten Muskulatur und der IgE Produktion führt (98). Außerdem produzieren Eosinophile und Mastzellen selbst IL-5. Durch diese autokrine Sekretion wird die Chronizität einer Entzündung verstärkt (96, 99).

Wegen seiner bedeutenden Rolle für die Entwicklung von und seiner Spezifität für Eosinophile ist IL-5 eine interessante Zielstruktur für die Behandlung Eosinophilen-assoziiierter Erkrankungen. Die meisten Erkrankungen, die mit Hypereosinophile einhergehen zeigen eine erhöhte IL-5 Produktion (100). Monoklonale Antikörper gegen IL-5 (Mepolizumab und Reslizumab) oder gegen die IL-5R α Kette (Benralizumab) verhindern die Signalübermittlung in Eosinophilen und führen so zu einer Depletion. Daher finden IL-5-Antikörpertherapien mit Mepolizumab, Reslizumab oder Benralizumab als Ergänzungstherapie zu inhalativen Kortikosteroiden in der Behandlung von schwerem Asthma schon heute Anwendung (101, 102). Klinische Studien für andere Eosinophilen-assoziierte Krankheitskomplexe wie die Eosinophile Ösophagitis (103) oder das Hypereosinophilie Syndrom (97) werden derzeit durchgeführt.

Die eosinophilen Granulozyten machen beim gesunden Menschen nur 1-3 % der Leukozyten im Differenzialblutbild aus. Im physiologischen Zustand wandern sie unter IL-5-Einfluss aus dem Knochenmark aus und verbleiben 8-12 Stunden im Blut. Von dort wandern sie ins Gewebe und überleben dort weitere 8-12 Tage. Im gesunden Organismus sind Eosinophile im Thymus, in der Milz, in Lymphknoten, im Uterus und besonders im Gastrointestinaltrakt zu finden, wo sie an der Gewebekomöostase und der Regulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems beteiligt sind. Im Krankheitsgeschehen wie beispielsweise einer

allergischen Entzündung, steigt die Zahl der Eosinophilen im Blut und in entzündeten Geweben wie Lunge, Herz oder Gastrointestinaltrakt drastisch an. Ab einem Wert von 0,5 pro nL im peripheren Blut spricht man beim Menschen von einer Eosinophilie. (104)

6.1.1. Sekundäre Granula

Die sekundären Granula bestehen aus einem dichten kristallinen Kern und einer Matrix, umgeben von einer Membran. Sie erhalten eine große Menge an Proteinen, Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Enzymen (90). Die gezielte Degranulation (105) der kationischen Proteine MBO, ECP, EPX und EDN ist hauptverantwortlich für die Gewebsschädigung und den Einfluss auf den Gewebeumbau in allergischen Reaktionen und anderen Entzündungsgeschehen (106).

Die Bestandteile der sekundären Granula werden über mindestens vier verschiedene Mechanismen an die Umgebung abgegeben: erstens die klassische Exozytose (107). Zweitens die *compound* Exozytose, bei der einzelne sekretorische Vesikel zuerst untereinander verschmelzen, bevor sie gebündelt mit der Zellwand verschmelzen. Diese Formen der Exozytose werden bei der Abwehr von Bakterien und Helminthen beobachtet (108). Drittens die so genannte *piecemeal* Degranulation (109), bei der kleine sekretorische Vesikel aus der Granula abgeschnürt werden und direkt mit der Zellwand verschmelzen. Und viertens die Zytolyse (110, 111), die mit einer Ruptur der Zellmembran und damit dem Zelltod einhergeht. Die letzten beiden Formen der Degranulation werden meist in Gewebe mit allergischen Entzündungsreaktionen beobachtet (112).

6.2. Funktionen in Physiologie und Pathologie

Eosinophile wurden über viele Jahre nur als seltene, unspezifische, zytotoxische Effektorzellen wahrgenommen, deren Anzahl bei Wurminfektionen, allergischen Reaktionen und Asthma erhöht ist. Obwohl viel über die Morphologie, Differenzierung und die Migration Eosinophiler bekannt war, hat erst die Forschung der letzten Jahrzehnte zu einem Paradigmenwechsel in der Wahrnehmung von eosinophilen Granulozyten geführt (7).

So zeigt eine Vielzahl an Studien ihre regulatorische Funktion auf die lokale Immunität sowie auf Remodeling- und Reparaturvorgänge in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen (113). Beispielsweise haben

Eosinophile einen Einfluss auf die postpubertäre Entwicklung der Mamma (114), auf den weiblichen Zyklus und die Umbauvorgänge im Uterus (115), auf die Abstoßungsreaktionen von Transplantaten (116) sowie auf Neoplasien (117). Daher erscheint einer Einteilung der Funktionen von Eosinophilen in drei Kategorien sinnvoll: a) direkte zytotoxische Effektorfunktionen, b) Geweberemodelling und -reparatur, c) Immunmodulation und Interaktion mit anderen Immunzellen (118).

Im Folgenden wird der Fokus auf die für die Erstellung dieser Arbeit wichtigen Funktionen gelegt. Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, ob Eosinophile einen direkten zytotoxischen Effekt im Infarktgeschehen haben oder die Infarktheilung durch Einflussnahme auf das Geweberemodelling oder gezielte Immunmodulation beeinflussen.

6.2.1. Zytotoxische Effektorfunktionen

Die direkten zytotoxischen Effektorfunktionen sind die klassischen Eigenschaften, mit denen eosinophile Granulozyten assoziiert werden.

Eosinophile spielen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen. So findet man bei Erkrankungen wie Asthma, Rhinosinusitis, eosinophiler Ösophagitis, eosinophiler Gastroenteritis und atopischer Dermatitis eine Gewebseosinophilie vor, die direkt mit der Entzündung und Gewebeerstörung assoziiert ist (119).

Neben den altbekannten Mechanismen zur Abwehr von Helminthen, konnten neuere Studien auch den Einfluss von Eosinophilen in der Abwehr gegen virale (120) und bakterielle (121) Infektionen zeigen. Hierbei spielt vor allem die Degranulation ihrer kationischen Granulaproteine eine tragende Rolle, die direkt zytotoxisch wirken – auf Pathogene sowie auf körpereigene Zellen.

Eosinophile Granulozyten besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose. Schon *in vitro* Versuche in den 1960er-Jahren konnten zeigen, dass Eosinophile verschiedenste Pathogene phagozytieren, darunter Bakterien, Pilze, Antigen-Antikörper-Immunkomplexe und körperfremde Zellen (122). Die Phagozytose von Eosinophilen unterscheidet sich jedoch in den Mechanismen und der Effizienz gegenüber der neutrophiler Granulozyten (123).

Außerdem besitzen Eosinophile die Fähigkeit, ähnlich wie zuvor bei Neutrophilen und Mastzellen beschrieben, so genannte *Eosinophil extracellular traps* (EETs) auszubilden. Als Reaktion auf Lypopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien entlassen sie in einem Katapult-ähnlichen Mechanismus ihre mitochondriale DNS. Diese netzartigen Strukturen enthalten kationische Granulaproteine, besonders MBP, um Bakterien gezielt abzutöten. Yousefi *et al.* konnten zeigen, dass sie so zur Abwehr gegen das Eindringen von Bakterien in Epithelien des Gastrointestinaltraktes beitragen (124). Inwieweit dieses Phänomen auf andere Funktionen von Eosinophilen übertragen werden kann, ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung.

6.2.2. Gewebsremodeling und -reparatur

Remodeling und Reparaturvorgänge sind Umbauvorgänge als Reaktion auf eine erhöhte Belastung, Läsionen oder Entzündungen und haben meist permanente strukturelle und funktionelle Veränderungen eines Gewebes oder Organs zur Folge. Viele Erkrankungen, die durch eine Gewebsinfiltration von Eosinophilen charakterisiert sind, darunter Asthma, eosinophile Myokarditis und eosinophile Ösophagitis, gehen mit einer anschließenden Fibrose einher. Diese ist maßgeblich verantwortlich für den Funktionsverlust der jeweiligen Organe und für Komplikationen bis hin zum Tod.

Eosinophile besitzen verschiedene Mediatoren, darunter TGF- β , den Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF, Matrixmetalloproteinasen (MMPs), den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), die sekundären Granulaproteine und Th2-Zytokine (IL-6, IL-13), mit denen sie Effekte auf das Bindegewebe und die Fibrose haben können. Durch Interaktion mit Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten können Eosinophile Einfluss auf deren Phänotyp, die Kollagensynthese, die Degradation und Reformation extrazellulärer Matrix sowie die Angiogenese nehmen (118).

TGF- β 1 aktiviert Fibroblasten und rekrutiert sie zum Ort der Entzündung. Es fördert die Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten (125) und Epithelzellen (126), was zu einer erhöhten Produktion von Kollagen und anderen extrazellulären Matrixproteinen führt. Außerdem fördert es die Proliferation glatter Muskelzellen (127) und trägt damit zum irreversiblen Umbau verschiedener Gewebe bei. Neben TGF- β 1 ist IL-13 (128) ein wichtiges

profibrotisches Zytokin im Geweberemodeling: Im murinen Asthma-Modell wurde belegt, dass die Überexpression von IL-13 zu einer Verstärkung der Atemwegsentzündung und der fibrotischen Veränderungen führt, während eine Inhibition eine gegenteilige Wirkung zeigt (129).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die kationischen Proteine der sekundären Granula neben ihren Gewebe-destruktiven Eigenschaften auch einen Einfluss auf die Funktion und die Aktivierung von mesenchymalen Zellen in Reparatur- und Umbauvorgängen haben können (130). Beispielsweise induziert MBP in Lungenfibroblasten die Synthese von proinflammatorischen und profibrotischen Zytokinen wie IL-6 und IL-11 (131). Weitere *in vitro* Versuche haben gezeigt, dass das ECP aus dem Überstand stimulierter Eosinophiler die Migration von Lungenfibroblasten (132) stimuliert. Außerdem erhöht ECP *in vitro* die Synthese von TGF- β 1 (133) und die intrazelluläre Akkumulation von Proteoglykanen (134). Auch in Epithelzellen scheinen die kationischen Proteine die Synthese von Remodelingfaktoren zu stimulieren: Die Inkubation mit MBP oder EPX erhöht in Bronchialepithelzellen die Synthese von profibrotischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie Endothelin-1, Fibronectin, MMP-9, Platelet-derived growth factor-3, TGF- α und TGF- β 1 (130, 135).

Die Duchenne-Muskeldystrophie ist eine degenerative Muskelerkrankung der Skelettmuskulatur und des Herzens, die mit einem Influx von Entzündungszellen, darunter auch Eosinophile, mit anschließender massiver Fibrose einhergeht. *In vivo* und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass MBP eine Lyse von Skelettmuskelzellen induziert und die Synthese und Ablagerung von Kollagen erhöht (136). Außerdem stimuliert ECP die Proliferation muriner kardialer Fibroblasten und die Neuordnung des Zytoskeletts in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (137). So könnte ECP auch im Herzen zur Reorganisation beitragen und so die kardialen Fibrosierung und Hypertrophie beeinflussen (130).

Eosinophile speichern und sezernieren Matrixmetalloproteinasen (138). Die Ausschüttung von MMP-3 und MMP-9 führt zu einer Degradation der extrazellulären Matrix und ermöglicht damit die Reorganisation des Gewebes, die Transmigration von Immunzellen und das Wachstum von Gefäßen (139).

Eosinophile scheinen auch über die Angiogenese einen Einfluss auf das Remodeling zu haben. Sie enthalten den *Vascular Endothelial Growth Factor*

(VEGF), der die Zellproliferation von Gefäßendothelzellen sowie die Genese und die Einsprossung von Kapillaren induziert. MBP verstärkt diesen mitogenen Effekt von VEGF. Dies konnte *in vitro* in Rattenaorten- und humanen Nabelschnurendothelzellen sowie *in vivo* in der Chorioallantoismembran von Hühnereiern gezeigt werden (140). Darüber hinaus enthalten Eosinophile proangiogenetische Faktoren wie Angiogenin, IL-6, IL-8, GM-CSF, den *platelet derived growth factor* (PDGF) und den *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (141).

Während Eosinophile in der Akutphase einer Entzündung in erster Linie proinflammatorisch wirken, scheinen in der chronischen Phase der Entzündung die profibrotischen Eigenschaften zu überwiegen (119, 142). Eosinophile Granulozyten tragen so zur Gewebereparatur bei. Im Falle einer Chronifizierung der Entzündung können sie aber auch zu klinischen Komplikationen bis hin zum Tod führen – beispielsweise durch irreversible Obstruktion der Atemwege bei Asthma (143), durch die endomyokardiale Fibrose beim hypereosinophilen Syndrom (HES) oder bei der eosinophilen Myokarditis (144).

6.2.3. Immunmodulation und Interaktion mit anderen Immunzellen

Wie eingangs erwähnt, wurden die immunmodulatorischen Eigenschaften von Eosinophilen lange vernachlässigt.

Unter physiologischen Bedingungen infiltrieren Eosinophile primäre und sekundäre lymphatische Organe wie Thymus, Lymphknoten, Milz und Peyer-Platten, wo sie vermutlich anderen Immunzellen bei der Ausreifung helfen (104, 145).

Eosinophile interagieren mit einer Vielzahl von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, darunter Neutrophile, Basophile, Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen, T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen (s. Abbildung 5).

T-Helferzellen sind die Hauptquelle von IL-5 und IL-13. IL-5 ist das Schlüsselzytokin für die Ausreifung von Eosinophilen. IL-13 erhöht die Produktion von Eotaxinen in lokalen Zellen und steuert so die Rekrutierung. Umgekehrt konnten erst aktuelle Studien in Eosinophilen-defizienten-Mausstämmen zeigen, dass die Abwesenheit von Eosinophilen zu einer Reduktion

von Th2-Zytokinen und der T-Zellrekrutierung in der Lunge führt (146). Somit kann man eher von einer bidirektionalen Interaktion zwischen Eosinophilen und T-Zellen ausgehen. Auch auf B-Lymphozyten scheinen Eosinophilen einen proliferativen Effekt zu haben (147). Ebenso konnte kürzlich in Eosinophilen-defizienten Δ dblGATA-1-Mäusen gezeigt werden, dass Eosinophile im Knochenmark durch Sekretion der Zytokine APRIL und IL-6 die Ausreifung und das Überleben von Plasmazellen fördern, also auch einen Einfluss auf B-Lymphozyten haben (148).

In vivo Experimente in Mäusen haben gezeigt, dass Eosinophile die Hauptquelle des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 im Fettgewebe (149), in der eosinophilen Myokarditis (9) und in einem Infektionsmodell mit pulmonaler Kryptokokkose (150) sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass Eosinophile durch die Expression von IL-4 das Mikromilieu in der Spätphase der Entzündung in eine proliferative Richtung lenken, was unter anderem zu einem Priming von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen und einer Polarisierung zu M2-Makrophagen führt. Dieses Zusammenspiel könnte im Infarktgeschehen zu einer übersteigerten Fibrose und linksventrikulären Dilatation führen.

Außerdem fungieren Eosinophile als Antigen-präsentierende Zellen. So konnte eine *in vitro*-Studie mit GM-CSF stimulierten Eosinophilen zeigen, dass

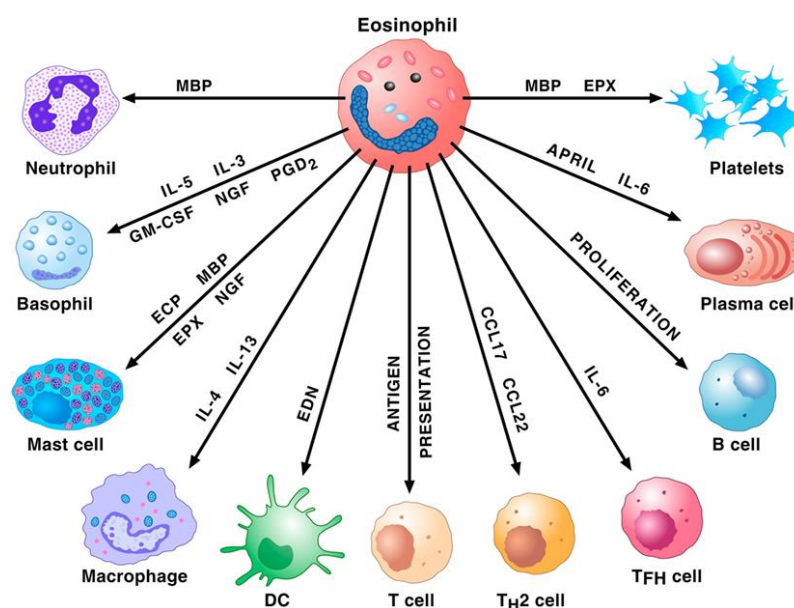


Abbildung 5: Eosinophile und ihre Interaktion mit anderen Immunzellen

Eosinophile Granulozyten interagieren über verschiedene Mediatoren mit einer Vielzahl an Immunzellen. Aktuelle Forschung mit Eosinophilen-defizienten Knockout-Linien ermöglicht neue Erkenntnisse über die immunmodulatorische Rolle von Eosinophilen.

Mit freundlicher Genehmigung von Frontiers Media, Copyright © 2017 (152)

Eosinophile mithilfe ihrer MHC II-Rezeptoren Antigene präsentieren und so eine Antigen-spezifische T-Zellproliferation auslösen (119, 151). (152)

Inwieweit die Interaktion zwischen Eosinophilen und anderen Immunzellen einen Einfluss auf die Umbauvorgänge nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden im Herzen hat, ist Ziel dieser Arbeit.

6.3. Kardiale Manifestation von Hypereosinophilie

Eosinophile scheinen einen fatalen Organotropismus zum Herzmuskel zu haben. So zeigen viele Erkrankungen, die mit einer Hypereosinophilie einhergehen eine kardiale Manifestation, die oft im Herzversagen mündet. So entwickeln 20-50 % der an idiopathischem Hypereosinophilem Syndrom (HES) erkrankten Patienten eine myokardiale Fibrose oder eine Entzündung des Endo-, Myo- oder Perikards (153). Bei der eosinophilen Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, früher Churg-Strauss-Syndrom) zeigen 30 % der Patienten eine kardiovaskuläre Manifestation (154).

Die Hypereosinophilie manifestiert sich meist als eosinophile Myokarditis, einer seltenen Form der Herzmuskelentzündung, die durch eine Infiltration von Eosinophilen charakterisiert ist. Neben den oben genannten immun-medierten Erkrankungen kann eine eosinophile Myokarditis auch als Hypersensitivitätsreaktion auf Medikamente (155), parasitäre Infektion (156) und paraneoplastisch (157) entstehen (158). Die Degranulation der aktivierten Eosinophilen führt zu einer massiven Gewebsschädigung und Entzündung. Vermutlich durch die Ausschüttung von TGF- β kommt es zu einer kardialen Fibrose, die zu einer verminderten Pumpleistung führt und im Herzversagen enden kann. Die kardiale Manifestation bei HES, EGPA oder parasitärer Herzerkrankungen ist die Hauptursache für die Mortalität. (159)

In einem murinen Experimentelle Autoimmun Myokarditis Modell (EAM) haben Diny *et al.* (9) den Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die Entstehung und das Fortschreiten der eosinophilen Myokarditis untersucht. Nach Induktion der EAM zeigten hypereosinophile IL-5Tg-Mäuse eine höhere Anzahl an infiltrierenden CD45⁺-Zellen, eine stärkere Herzmuskelentzündung, eine ausgeprägtere Fibrose, eine schlechtere Herzfunktion und eine ausgeprägtere linksventrikuläre Dilatation im Vergleich zu den Wildtyp Balb/c-Mäusen (WT). Umgekehrt entwickelten die Eosinophilen-defizienten Δ dblGATA1-Mäuse zwar

ein ähnliches Ausmaß der EAM ohne Unterschied an infiltrierenden CD45⁺-Zellen, zeigten jedoch in den ultrasonographischen Untersuchungen signifikant bessere linksventrikuläre Funktionsparameter und Dimensionen im Vergleich zu den WT-Tieren. Daraus schlossen sie, dass der Einfluss der Eosinophilen nicht auf der Verstärkung des Entzündungsprozesses, sondern der Beeinflussung des langfristigen Geweberemodelings basiert und so die Eosinophilen-defizienten Tiere vor der dilatativen Kardiomyopathie schützt. In IL-4-Reportermäusen konnten sie zeigen, dass Eosinophile die Mehrheit der IL-4-sezernierenden Zellen ausmachen und dass IL-4^{-/-}-Mäuse genau wie die Eosinophilen-defizienten Δ dblGATA1-Mäuse vor der dilatativen Kardiomyopathie geschützt sind.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Ausschüttung von IL-4 durch eosinophile Granulozyten das Fortschreiten der dilatativen Kardiomyopathie verstärkt und sich damit langfristig negativ auf die Herzfunktion auswirkt. Der profibrotische Effekt von IL-4 konnte auch in einer Studie im Zusammenhang mit systemischer Hypertension bestätigt werden (160). Dass Eosinophile in anderer Umgebung Makrophagen in Richtung M2-Phänotyp polarisieren können, hat eine Studie von Wu *et al.* gezeigt, in der der Einfluss von Eosinophilen auf Fettgewebsmakrophagen untersucht wurde (149). Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, ob diese Erkenntnisse auf das Ischämie-Reperusionsmodell und das Remodelling nach einem Myokardinfarkt übertragbar sind.

Auch wenn wenig über den Organotropismus Eosinophiler zum Herzmuskel bekannt ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Eosinophilen aus evolutionärer Sicht eine Abwehrfunktion gegen Parasiten im Herzen einnehmen, aber wie in diesem Fall auch Schaden an körpereigenen Geweben verursachen (161). Einen Erklärungsversuch für den Mechanismus bietet eine weitere Veröffentlichung von Diny *et al.* (159), in der sie zeigen, dass Makrophagen und kardiale Fibroblasten die kardiale Infiltration von Eosinophilen über die Ausschüttung von Eotaxin-1 (CCL11) und Eotaxin-2 (CCL24) regulieren. Im oben beschriebenen EAM-Modell konnten sie die Signalwege für das Einwandern von Eosinophilen ins Herzgewebe klären. Sie zeigen, dass Eosinophile mit ihrem CCR3-Rezeptor das Herzgewebe als Reaktion auf eine vermehrte Ausschüttung von Eotaxin-1 und Eotaxin-2 infiltrieren. Ersteres wird hauptsächlich von kardialen Fibroblasten, letzteres von F4/80⁺-Makrophagen gebildet. Außerdem konnten sie die vermehrte

Ausschüttung dieser Eotaxine auch in endomyokardialen Biopsien von Patienten mit eosinophiler Myokarditis bestätigen.

Ausgehend von der Korrelation zwischen Hypereosinophilie und kardialer Manifestationen kann davon ausgegangen werden, dass eosinophile Granulozyten einen negativen, verstärkenden Einfluss auf die Entstehung und das Fortschreiten von kardiovaskulären Erkrankungen haben.

6.4. Eosinophile in kardiovaskulären Erkrankungen

Neben Immunzellen interagieren Eosinophile auch mit Thrombozyten und können dadurch Einfluss auf die Thrombusformation und -stabilität nehmen. Der Einfluss der Interaktion zwischen Eosinophilen und Thrombozyten auf Krankheitsbilder wie Asthma, Allergien (162) und in der Abwehr gegen Pathogene (163) ist bereits beschrieben. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass sie ebenso eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen wie der arteriellen und venösen Thrombose, der Atherosklerose und des akuten Myokardinfarkts spielen.

Eosinophile können mit Thrombozyten sowohl über direkten Kontakt agieren, über die P-Selektin/P-Selektin Glykoproteinligand 1 (PSGL-1)-Bindung (164), als auch indirekt über lösliche Faktoren: Eosinophile sezernieren beispielsweise den *platelet-activating factor* (PAF), die eosinophile Peroxidase (EPX) und das *major basic protein* (MBP), die allesamt aktivierend auf Thrombozyten und somit prothrombotisch wirken. Umgekehrt sezernieren Thrombozyten PF-4, RANTES und IL-1 β , die wiederum chemotaktisch bzw. aktivierend auf Eosinophile wirken. (162, 165) Außerdem wirkt MBP als direkter Inhibitor auf Thrombomodulin, einem wichtigen antikoagulatorischen Endothel-Protein (166).

Darüber hinaus sind Eosinophile ein großer zellulärer Speicher von *tissue factor* (Faktor III oder Gewebethromboplastin), der bei der Degranulation freigesetzt wird und die Gerinnungskaskade initiiert (167). Ebenso wie andere Leukozytenfraktionen könnten sie so zur Thrombogenese beitragen (168).

In einem vorrangegangenen Forschungsprojekt in dieser Arbeitsgruppe wurde die Interaktion eosinophiler Granulozyten mit Thrombozyten in der arteriellen Thrombose erforscht. In einem Modell zur arteriellen Thrombose durch Verletzung der *Arteria carotis* mit FeCl₃ konnten gezeigt werden, dass

Eosinophile den Thrombus infiltrieren und diesen durch Ausschüttung ihres zytotoxischen *Major Basic Proteins* stabilisieren. *In vitro* wurde außerdem gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten eosinophile Granulozyten aktivieren und die Bildung von *Eosinophil Extracellular Traps* (EETs) fördern, wodurch der Thrombus zusätzlich stabilisiert wird. (169)

Auch beim akuten Koronarsyndrom kommt es zur Bildung eines Thrombus, meist auf Grundlage einer rupturierten oder erodierten atherosklerotischen Plaque und in Folge dessen zum Verschluss eines Herzkranzgefäßes. Die Atherosklerose ist ein chronisch entzündlicher Prozess, in dem Eosinophile eine Rolle spielen könnten.

Beispielsweise konnten Haley *et al.* (170) zeigen, dass Eotaxin-1 und sein Rezeptor CCR3 in humanen atherosklerotischen Gefäßen überexprimiert wird. Tanaka *et al.* (171) berichten in einer aktuellen Studie über eine Korrelation zwischen der Anzahl an Eosinophilen im Thrombus und dem Grad der arteriellen Okklusion. Sie vermuten, dass Eosinophile durch direkte Interaktion mit anderen Immunzellen und die Sekretion von Mediatoren Einfluss auf die sterile Entzündungsreaktion nehmen. Niccoli *et al.* (172) zeigen eine Assoziation zwischen dem Serumspiegel an *Eosinophil cationic protein* (ECP), einem sensitiven Marker für die Aktivierung von Eosinophilen, und dem Wachstum atherosklerotischer Plaques und schlagen diesen als zusätzlichen Biomarker zur Evaluation atherosklerotischer Plaques bei der koronaren Herzkrankheit vor. (173)

Damit übereinstimmend, konnten Uderhardt, Ackermann *et al.* (174) einen erhöhten ECP-Plasmaspiegel als Risikoindikator für eine bevorstehende Atherothrombose und die Entstehung fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen identifizieren. Auch diese Veröffentlichung bestätigt, dass Eosinophile den Thrombus infiltrieren und die Thrombusformation verstärken. *In vitro* konnten sie zeigen, dass Eosinophile in der Lage sind, abhängig von *tissue factor* Thrombin zu generieren. Darüber hinaus zeigen sie, dass Eosinophile durch eine spezifische Veränderung ihrer Zelloberfläche, nämlich die Translokation bestimmter Aminophospholipide, zusätzlich prokoagulativ wirken können.

Daher ist anzunehmen, dass eosinophile Granulozyten nicht nur bei der Entstehung der atherosklerotischen Plaques, sondern auch bei der Formation des Thrombus, im Falle einer Ruptur, eine Rolle spielen: Verschiedene Studien haben

Thrombus-Aspirate aus perkutanen Koronarinterventionen von Patienten mit akutem Myokardinfarkt histologisch untersucht. Sie zeigen eine deutliche Infiltration durch eosinophile Granulozyten bei gleichzeitigem Abfall im peripheren Blut. Außerdem zeigen sie eine inverse Korrelation zwischen der Menge an peripheren Eosinophilen und dem Troponin-I Level: je geringer die Anzahl an zirkulierenden Eosinophilen, desto höher der Troponin-I-Spiegel und damit desto größer die Schädigung des Herzmuskelgewebes. (11)

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Eosinophilen den Thrombus infiltrieren, dort Thrombozyten aktivieren, so die Thrombusformation verstärken und damit die Okklusion des Herzkranzgefäßes und damit die Folgen des Myokardinfarktes verschlimmern. Eine weitere Studie, in der Thrombus-Aspirate histologisch untersucht wurden, zeigt eine Korrelation zwischen der Anzahl infiltrierender Eosinophiler und der Größe des arteriellen Thrombus (8).

Andere retrospektive klinische Studien zeigen Korrelationen zwischen der Anzahl peripherer Eosinophilen (10, 13) bzw. der Anzahl Eosinophiler im Verhältnis zur Gesamtleukozytenzahl (12) vor einer perkutanen koronaren Intervention und dem Langzeitüberleben bzw. dem Auftreten schwerer kardialer Komplikationen, so genannter *major adverse cardiac events* (MACE). Trotz unterschiedlicher Herangehensweise und statistischer Auswertung stimmen die Studien darin überein, dass, je geringer die Anzahl der Eosinophilen im Differenzialblutbild, desto schlechter die Prognose für das Langzeitüberleben nach perkutaner koronarer Intervention ist.

In einer Studie von Rios-Navarro *et al.* (10) aus dem Jahr 2018 wurde die Dynamik von Eosinophilen im Blut und im infarzierten Myokard in Patienten und im Schweinemodell untersucht. Serielle Blutanalysen bei 620 Patienten mit ST-Hebungsinfarkt zeigen, dass es nach der Reperfusion durch Katheterisierung zu einem deutlichen Abfall der peripheren Eosinophilen kommt; mit einem Nadir 12 h nach Intervention. Mittels serieller kardialer Magnetresonanztomographie wurden das Auftreten intrakardialer Ödeme und mikrovaskulärer Obstruktionen sowie die Infarktgröße evaluiert und eine deutliche Assoziation zwischen Eosinophilen-Zahl und dem Ausmaß der strukturellen myokardialen Veränderungen festgestellt. Zu allen Messzeitpunkten gilt: je geringer die Anzahl der zirkulierenden Eosinophilen, desto größer der strukturelle Schaden im Myokard. Das heißt, Patienten mit einer geringeren Anzahl peripherer Eosinophiler zeigen

größere Infarktbereiche, ausgeprägtere Ödeme und mikrovaskuläre Obstruktionen. Auch im *follow-up* der Patienten bestätigt sich der schädliche Einfluss Eosinophiler im Infarktgeschehen, denn, je geringer die Eosinophilen-Zahl, desto wahrscheinlicher das Auftreten schwerer kardialer Komplikationen (plötzlicher Herztod, nicht-fatale Reinfarzierung, Herzversagen).

Im Schweine-Modell wurden zusätzlich basale Blutwerte vor dem Ischämie-Reperfusionsschaden genommen, was beim Patienten logischerweise nicht möglich war (s. Abbildung 6). Diese zeigen einen rapiden Anstieg der Eosinophilen während der Ischämie, gefolgt von einem deutlichen Abfall kurz nach der Reperfusion, wie bei den Patienten.

Histologische Untersuchungen der Schweineherzen bestätigten das Vorkommen Eosinophiler im Infarktbereich bis in spätere Phasen der Infarktheilung, besonders in Bereichen mit hoher struktureller Zerstörung des Gewebes. In Herzen von Patienten mit chronischem Infarkt wurden auch persistierende Eosinophile immunhistologisch nachgewiesen. Dass Eosinophile das Infarktgebiet infiltrieren, wurde bereits 1978 von Fishbein *et al.* beschrieben (175). (10)

Außerdem wurden in der Studie von Rios-Navarro *et al.* bei einer kleinen Patientengruppe das Serumlevel von Interleukin-5 Level, dem *Eosinophil cationic protein* und Eotaxin-1 bestimmt. Für IL-5 und ECP war ein deutlicher Anstieg im

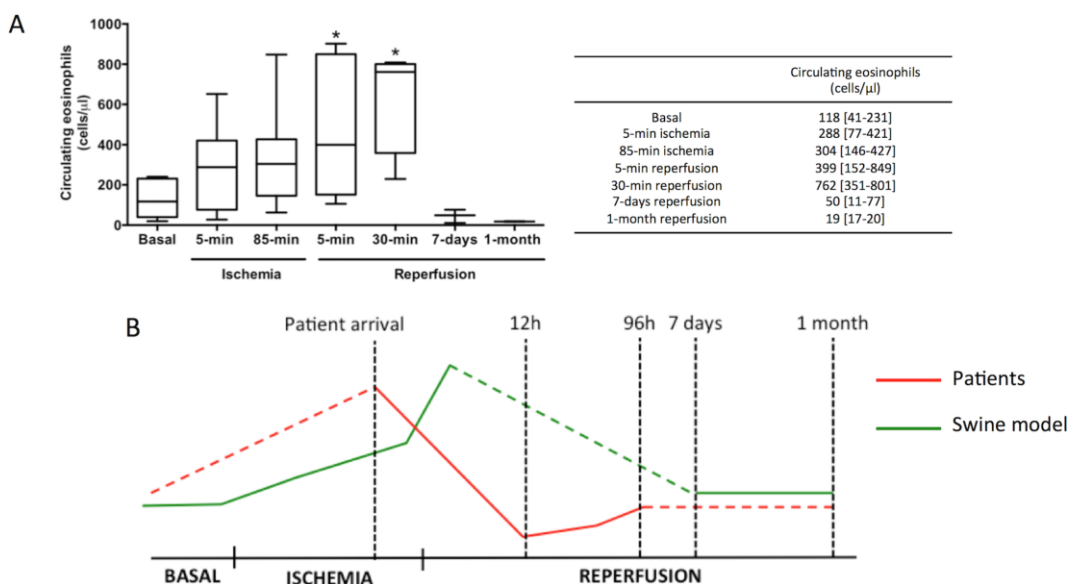


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der zirkulierenden Eosinophilen während Ischämie und Reperfusion in STEMI-Patienten und im Schweinemodell

Die serielle Messung der zirkulierenden Eosinophilen steigt eine deutliche Mobilisation während der Ischämie und einen ebenso deutlichen Abfall nach der Reperfusion. Der plötzliche Abfall lässt auf eine Infiltration ins Infarktgebiet schließen.

Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar, der sich erst nach einem Monat auf Normalwert einpendelt, während bei Eotaxin-1 keine dynamischen Unterschiede erkennbar waren. (10)

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Eosinophilen gemeinsam mit anderen Entzündungszellen den Infarktbereich infiltrieren, dort die Entzündungsreaktion beeinflussen und so den Ischämie-Reperfusionsschaden verstärken.

Unter Berücksichtigung der Rolle von Eosinophilen in Geweberemodeling und -reparatur (s. II.6.2.2) ist besonderes Augenmerk auf die Tatsache zu legen, dass die Eosinophilen sehr viel länger im Infarktgebiet verweilen als andere Entzündungszellen. Gemeinsam mit den Ergebnissen von Diny *et al.* (9) aus dem Myokarditis-Modell legt dies die Vermutung nahe, dass sich der Einfluss der Eosinophilen nicht nur auf die Akut- und Entzündungsphase beschränkt, sondern auch im chronischen Prozess der Infarktheilung zu finden ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eosinophile Granulozyten an unterschiedlichen Ansatzpunkten in der Pathogenese und dem Verlauf des Myokardinfarkts Einfluss nehmen können: in der Pathogenese der sterilen Entzündung der Atherosklerose, bei der Formation und Stabilisierung des Thrombus nach Ruptur der atherosklerotischen Plaque, in der Entzündungsreaktion der Akutphase nach der Reperfusion und in der chronischen Phase im Laufe der Infarktheilung.

III. ZIELSETZUNG

Die Infarktheilung ist ein hochgradig komplexer Vorgang, bei dem die infiltrierenden Immunzellen räumlich und zeitlich teils kontroverse Funktionen erfüllen. Ein detailliertes Verständnis der zellulären Vorgänge und Mechanismen der Einflussnahme ist unentbehrlich, um daraus therapeutische Strategien abzuleiten. Die Funktion eosinophiler Granulozyten im Myokardinfarkt und im kardialen Remodeling ist bisher kaum erforscht.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Rolle von Eosinophilen in der Infarktheilung in einem murinen Herzinfarkt-Modell mit Eosinophilen-defizienten Mäusen und einer Kontrollgruppe zu untersuchen.

Mithilfe der Positron-Emissions-Tomographie (PET) wird die Infarktgröße und Herzfunktion zu verschiedenen Zeitpunkten der Infarktheilung gemessen. Histologisch werden die Fibrosefläche, die Anzahl an infiltrierenden Entzündungszellen und die Gefäßdichte im Perinfarktbereich untersucht.

Es gibt eine Vielzahl an Mechanismen, über die Eosinophile Einfluss auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling nehmen können. Um diese Mechanismen zu untersuchen, soll die Zytokinexpression in infarzierten Herzen zwischen den Gruppen verglichen werden. Daraus sollen mögliche Zytokine charakterisiert werden, die die Rolle der Eosinophilen erklären.

Ebenso könnte die Rolle der eosinophilen Granulozyten in der Interaktion mit anderen Immunzellen sowie deren Polarisierung und Chemotaxis liegen. Durchflusszytometrische Untersuchungen sollen Aufschluss über den Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf die kardiale Immunzellkomposition und deren Subpopulationen geben. Außerdem sollen *in vitro*- Methoden etabliert werden, um den Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die Polarisierung und die Migration von Monozyten und Makrophagen zu untersuchen.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen könnten sich neue therapeutische Ansätze zur Beeinflussung der Immunreaktion infolge eines Myokardinfarktes ableiten lassen.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsaufbau

8-12 Wochen alten Mäusen aus einer Eosinophilen-defizienten Knockout-Gruppe und einer Kontrollgruppe wurden durch transiente Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) der linken Koronararterie (LCA) ein Ischämie-Reperfusionsschaden zugefügt. Zur Untersuchung der darauffolgenden Umbauvorgänge und des Einflusses von eosinophilen Granulozyten darauf, wurden folgende Methoden angewandt (s. Abbildung 7):

An Tag 6 und Tag 30 wurden die Infarktgröße, die linksventrikulären Funktionsparameter, die Ventrikeldilatation und -hypertrophie in beiden Gruppen mittels Positron-Emissions-Tomographie gemessen.

OP: LAD-Ligatur	Infarktheilung/Kardiales Remodeling		
Tag 0	Tag 2	Tag 6	Tag 30
		PET <ul style="list-style-type: none"> • Totales Perfusionsdefizit • Ejektionsfraktion • Enddiastolisches Volumen • Metabolisches Volumen 	PET <ul style="list-style-type: none"> • Totales Perfusionsdefizit • Ejektionsfraktion • Enddiastolisches Volumen • Metabolisches Volumen
Durchflusszytometrie <ul style="list-style-type: none"> • Untersuchung der Immunzellpopulationen 	Durchflusszytometrie <ul style="list-style-type: none"> • Untersuchung der Immunzellpopulationen 	Durchflusszytometrie <ul style="list-style-type: none"> • Untersuchung der Immunzellpopulationen 	
ELISA <ul style="list-style-type: none"> • IL-5 • Eotaxin-1 	ELISA <ul style="list-style-type: none"> • IL-5 • Eotaxin-1 	ELISA <ul style="list-style-type: none"> • IL-5 • Eotaxin-1 	
		Kardiale <u>Zytokinexpression</u>	Histologie <ul style="list-style-type: none"> • <u>Fibrosefläche</u> • Anzahl Makrophagen • Kapillardichte

Abbildung 7: Übersicht über die verwendeten Methoden

An Tag 30 wurden die Versuchstiere getötet, das Herz entnommen, um mittels immunhistologischer Untersuchungen mögliche Unterschiede in der Fibrosefläche, Kapillardichte im Perinfarktbereich und in der Menge an infiltrierenden Makrophagen zu untersuchen.

Im *steady state*, an Tag 2 und an Tag 6 wurden durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS) im Blut und in den Herzen von Wildtyp-Kontrolltieren und Eosinophilen-defizienten Knockout-Tieren durchgeführt, um den Einfluss

von eosinophilen Granulozyten auf andere Entzündungszellen und deren Subpopulationen zu untersuchen.

An Tag 6 wurde die Zytokinexpression im Herzen zwischen Wildtyp und Knockout mithilfe eines Zytokinarrays verglichen, um mögliche Zytokine und andere Mediatoren zu identifizieren, die den Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die Infarktheilung erklären können.

In Wildtyp-Mäusen wurde im *steady state*, an Tag 2 und an Tag 6 nach Infarktinduktion die IL-5- und Eotaxin-1-Konzentration mithilfe eines ELISAs bestimmt, um zu untersuchen, ob es im murinen Organismus infolge eines Myokardinfarktes zu einem systemischen Anstieg kommt. IL-5 und Eotaxin-1 sind die Schlüsselzytokine für die Proliferation und Chemotaxis von Eosinophilen.

In vitro wurde der Einfluss von Eosinophilen auf den Phänotyp bzw. die Polarisierung sowie die Migration von Monozyten und Makrophagen untersucht.

2. Versuchstiere

Als Versuchstier für alle dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuche wurde die Maus (*Mus musculus domesticus*) verwendet. Mäuse sind die in Deutschland am häufigsten genutzten Versuchstiere und eignen sich wegen ihrer hohen genetischen Übereinstimmung mit dem humanen Genom, ihrer kurzen Reproduktionszyklen und der Verfügbarkeit verschiedenster gentechnisch modifizierter Knockout-Linien für die Erforschung immunologischer Funktionen besonders gut.

Der Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe, in der diese Doktorarbeit angefertigt wurde, liegt auf den molekularen und zellulären Mechanismen der Migration und Entwicklung von Immunzellen mit besonderem Augenmerk auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Daher verfügt die Arbeitsgruppe über eine große Expertise in muriner Immunologie. Ebenso sind das verwendete Ischämie-Reperusionsmodell zur Induktion eines Myokardinfarkts, die Evaluierung der Herzfunktion mittels PET und die immunhistochemische Methodik etabliert.

2.1. Übersicht der verwendeten Mauslinien

Grundlegende histologische Untersuchungen zur Verteilung und zeitlichen Infiltration von eosinophilen Granulozyten nach einem Myokardinfarkt wurden an C57BL/6J-Mäusen durchgeführt.

Zur Untersuchung der Rolle von eosinophilen Granulozyten auf das kardiale Remodeling wurden Δ dblGata1-Mäuse mit Balb/c Hintergrund verwendet, die durch den Knockout des *Gata binding Protein 1* so genmodifiziert wurden, dass sie keine Eosinophilen ausbilden. Als Kontrollgruppe wurden Balb/c Wildtyp-Tiere verwendet.

Im Folgenden werden die einzelnen Mauslinien näher erläutert:

2.1.1. C57BL/6J

Zur Beantwortung der Frage, wann, in welcher Anzahl und in welcher räumlichen Verteilung Eosinophile in das infarzierte Gewebe einwandern, wurden histologische Untersuchungen an C57BL/6J-Mäusen angefertigt.

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden histologische Schnitte von gesunden Herzen sowie an Tag 2, Tag 6 und Tag 30 nach Infarktinduktion angefertigt.

2.1.2. C.129S1(B6)-Gata1^{tm6Sho}/J (Δ dblGATA1)

Um die Rolle der eosinophilen Granulozyten auf das kardiale Remodeling zu erforschen, wurden C.129S1(B6)-Gata1^{tm6Sho}/J-Mäuse, im Folgenden Δ dblGATA1, GATA1 ko oder Knockout-Gruppe genannt, von *The Jackson Laboratory* erworben.

Das Gata1 Gen liegt X-chromosomal und codiert den Transkriptionsfaktor *Gata binding Protein 1*, der für die Entwicklung von Mastzelllinien, erythroiden, mekaryoiden und eosinophilen Zelllinien verantwortlich ist. Die Deletion der hochaffinen GATA *binding* Sequenz im GATA1 Promoter-Gen führt zu einer vollständigen und selektiven Ablation der Eosinophilen-Zelllinie, auch unter Stimulation (176).

Mit Hilfe eines Vektors wird die palindromische Doppelbasensequenz Gata1 durch eine *floxed* PGK-neo Kasette ersetzt. Dieser Vektor wird dann mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht. Um den PGK-neo Promotor zu entfernen, werden die Zellen mit einem *cre recombinase* Vektor

transfiziert, sodass die Doppel-GATA-Sequenz durch eine einfache loxP ersetzt ist. Diese Zellen werden in C57BL/6-Blastozysten injiziert und die entstehenden Chimären mit C57BL/6 und anschließend BALB/c zurückgekreuzt, um homozygote Tiere zu erhalten (93).

Andere von GATA-1 abhängige Zelllinien wie die erythroide, megakaryoide oder die Mastzell-Linien werden nicht beeinflusst. Die Tiere sind uneingeschränkt lebensfähig, fertil und von normaler Größe. Diese Mauslinie ist eine gebräuchliche Linie zur Untersuchung der Funktion von Eosinophilen in physiologischen und pathologischen Zuständen.

2.1.3. Balb/cJ (Wildtyp)

Balb/cJ ist einer der in der Forschung am gebräuchlichsten Inzuchtmausstämme und wurde als Kontrollgruppe ausgewählt, da die Δ dblGATA1 auf einem Balb/c Hintergrund rückgekreuzt wurden.

Die histologische Quantifizierung der Fibrose infolge des Ischämie-Reperfusionsschadens in den verschiedenen Versuchsgruppen ist ein zu untersuchender Aspekt dieser Arbeit. Eine vergleichende Studie mit ähnlichem Versuchsaufbau wie dem zuvor beschriebenen hat gezeigt, dass der Ausgang der Infarkttheilung stark vom genetischen Hintergrund der Mauslinie abhängt (177). So zeigen Balb/cJ-Mäuse eine verminderte kardiale Fibrose, eine geringe Inzidenz von kardialen Rupturen und eine hohe Überlebensrate trotz schlechterer kardialer Funktion und Durchmesser und einer ausgeprägteren Ausdünnung des linken Ventrikels im Vergleich zu C57BL6, FVB, 129S6 und Swiss Mäusen. Eine weitere Veröffentlichung legt nahe, dass sich verschiedene Mauslinien im Ausmaß der Fibrosebildung in verschiedenen Organen erheblich unterscheiden. So zeigen Balb/cJ Mäuse eine Resistenz gegen pulmonale Fibrose, eine Anfälligkeit für hepatische Fibrose und eine verminderte kardiale Fibrose im Vergleich zu anderen Mauslinien (178).

2.2. Tierhaltung, Zucht und Hygiene

Die Tiere wurden bei *The Jackson Laboratory* erworben, in der Tierhaltung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) gezüchtet und dann in den Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums verbracht, wo sie nach mindestens 7 Tagen Eingewöhnungszeit in den Versuch überführt wurden.

In der Tierhaltung des ZNP (AAALAC-zertifiziert) erfolgt die Haltung und Züchtung unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen mit geschlossenen Barriersystemen und Überdruckbelüftung. Je nach Alter und Gewicht werden maximal fünf Tiere pro Käfig (IVC-System, THKB-M2V-M Polysulfonkäfig Typ M II, verlängert) gehalten. Die Tiere erhalten eine *ad libitum* Fütterung mit Standardfutter für Labornager (Standardfuttermittel, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest); Zuchttiere erhalten ein hochkalorisches Zuchtfutter. Wasser steht über Tränkeflaschen ebenso unbegrenzt zur Verfügung. Die Raumtemperatur beträgt 21°C und die Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %. Der Tag-Nacht-Rhythmus wird über ein 12 Stunden-Lichtprogramm mit Zeitschalter gesteuert.

Der SPF-Status der Haltung wird regelmäßig nach FELASA Richtlinien mit Hilfe von Sentinel-Mäusen überprüft.

Im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums erfolgt die Haltung entsprechend den erforderlichen speziellen Hygienebedingungen (FELASA erweitert). Die Tiere werden in Standard Makrolon Käfigen (Greenline IVC SealsavePLUS, Techniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. Bezüglich Besatzdichte, Fütterung, Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit und Lichtprogramm entspricht die Haltung der im ZNP.

Der Gesundheitsstatus der Tiere wird vierteljährlich mit dem erweiterten FELASA-Protokoll und entsprechenden Richtlinien überprüft. Darüber hinaus erfolgen Stichproben nach dem kleinen FELASA Protokoll.

3. Operation

Um die klinische Situation eines akuten Myokardinfarkts mit anschließender perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie zu simulieren, wird den Versuchstieren der *Ramus interventricularis anterior* (RIVA), im Folgenden LAD (aus dem Englischen *left anterior descending coronary artery*) genannt, der linken Koronararterie (LCA) ligiert und nach einer Stunde reperfundiert (179). Die LAD versorgt das intraventrikuläre Septum, die anteriore linke Herzwand und die Herzspitze.

3.1. Narkose

Für die Narkose wurde eine im Versuchstierbereich übliche Kombination aus Inhalationsnarkose zur Einleitung und anschließender Triple-Injektionsnarkose

zur Aufrechterhaltung der Narkose verwendet. Die im Folgenden beschriebene initiale Inhalationsnarkose dient der Stressreduktion für das Versuchstier und der Vermeidung von Komplikationen bei der intraperitonealen Injektion.

Zur Narkoseeinleitung wurden die Mäuse in einen Plexiglaszylinder gesetzt, dessen eine Seite mit einem Isofluran-Verdampfer (Datex-Ohmeda Isotec 5, UniVet Porta Fa. Groppler, Deggendorf), die andere Seite mit einem Absaugeschlauch verbunden ist. Die Röhre wurde anschließend mit einem 5 %-igen Isofluran-Sauerstoffgemisch (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) geflutet und die Maus so lange darin belassen, bis der Stellreflex aussetzt und sich die Atmung verlangsamt.

Um eine Allgemeinanästhesie zu erreichen, wurde daraufhin eine sogenannte vollständig antagonisierbare Anästhesie (VAA) verwendet, bestehend aus dem Opioid Fentanyl (0,05 mg/kg; Fentadon, Albrecht GmbH Aulendorf), dem Benzodiazepin Midazolam (5,0 mg/kg; Midazolam, B. Braun, Melsungen) und dem α_2 -Agonisten Medetomidin (0,5 mg/kg; Dorbene vet, zoetis Deutschland GmbH, Berlin). Die Injektion erfolgte intraperitoneal und leicht kopfüber, um eine Perforation von Darm und Blase zu vermeiden.

Kleinsäuger zeichnen sich durch ein häufiges Auftreten von Narkosezwischenfällen aus. Störungen von Atmung, Kreislauf und Thermoregulation treten insbesondere in der Nachschlafphase auf, daher ist die Verwendung einer antagonisierbaren Narkose unbedingt anzuraten. Die Verwendung einer Triple-Narkose erfüllt die Voraussetzungen einer Allgemeinanästhesie (Hypnose, Analgesie und Muskelrelaxation). Die synergistischen und potenzierenden Wechselwirkungen der Anästhetika ermöglichen eine Reduktion der Injektionsdosen und damit der Kreislaufdepression und Narkosezwischenfälle auf ein Mindestmaß.

Das Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde mithilfe des Zwischenzehenreflexes geprüft. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde nach 40 min eine halbe Dosis intraperitoneal nachapplied. Im Laufe der Operation wurde die Narkostiefe regelmäßig überprüft und gegebenenfalls nachdosiert.

Die kompetitive Antagonisierung erfolgte nach OP-Ende mit dem Benzodiazepin-Antagonist Flumazenil (0,72 mg/kg; Flumazenil, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing) und mit dem α_2 -Antagonist Atipamezol (3,75 mg/kg; Alzane, zoetis

Deutschland GmbH, Ulm). Fentanyl zeichnet sich neben seiner hohen analgetischen Potenz durch eine sehr kurze Wirksamkeit aus und wurde daher im Normalfall nicht antagonisiert. Zur postoperativen Schmerzabdeckung wurde Buprenorphin (0,1 mg/kg; Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) zum Ende der OP und dann zwei Mal täglich für weitere drei Tag subkutan injiziert.

3.2. Intubation

Da es sich bei der nachfolgenden Operation um einen Eingriff am offenen Thorax handelt, wurden die Versuchstiere intubiert. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde die Maus mit vier Klebepflasterstreifen (Transpore, 3M Deutschland GmbH, Neuss) rücklings auf einer Wärmeplatte fixiert und die dazugehörige Temperatursonde (TMF-3402 Rektaltemperatur Messfühler, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) in Position gebracht, die über ein Temperatur-Kontrollmodul (-0904, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) verbunden die Körpertemperatur der Maus regulieren. Die konstante Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf 37,5°C ist im vorliegenden Versuchsaufbau besonders wichtig, da der Gesamtstoffwechsel ebenso wie der kardiale Sauerstoffverbrauch von der Körpertemperatur abhängt und somit Schwankungen in der Temperatur das Ausmaß der Ischämie und damit die Versuchsergebnisse beeinflussen können.

Zum Schutz der Hornhaut wurde in beide Augen eine Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, BayernVital GmbH, Leverkusen) appliziert. Zur Erleichterung der Intubation wurde der Kopf mit einem an der Wärmeplatte befestigten Gummiband überstreckt. Mit einer handelsüblichen Enthaarungscreme wurde der mediane Halsbereich und die linke Thoraxseite enthaart und anschließend mit Iod desinfiziert. Die Intubation fand unter visueller Kontrolle statt. Dazu wurde die Haut auf Höhe des Larynx in der Medianen entlang der Trachea ca. 1 cm eröffnet und die Trachea unter Schonung der *Glandula parotis* freipräpariert. Als Tubus wurde eine 19G Metallkanüle verwendet, die nun unter Sichtkontrolle über den Pharynx in der Trachea platziert wurde. Das Beatmungsgerät (MiniVent Type845, Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten) wurde auf eine Atemfrequenz von 150 pro min und ein Atemvolumen von 200 µl eingestellt. Nach Kontrolle des Intubationserfolgs wird der Hautschnitt mit Einzelheften vernäht (7-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt).

3.3. Ischämie-Reperfusionsmodell

Die nachfolgenden Schritte der linksseitigen Thorakotomie wurden unter einem OP-Mikroskop (Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Auf Höhe des zweiten Interkostalraums wurde eine Hautinzision gesetzt und die *Mm. pectorales* und der *M. rectus thoracis* durchtrennt, um die *Mm. intercostales* freizulegen, die die Brusthöhle nach außen abschließen. Danach wurde die Zwischenrippenmuskulatur des zweiten Interkostalraums mit einer Mikroschere vorsichtig durchtrennt und damit der Thorax eröffnet. Zur besseren Darstellung des Herzbeutels und der Herzkranzgefäße wurden die 2. und 3. Rippe mit jeweils zwei Fäden (5-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) umstochen und durch Zug nach kranial bzw. kaudal wird der Interkostalraum gespreizt.

Anschließend wurde das Perikard vorsichtig eröffnet und zum Schutz der Lunge über die Pleura gelegt. Die zwischen Pulmonalarterie und linkem Herzhorn liegende LAD wurde mit einem Faden (8-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) umstochen und unter Verwendung eines Platzhalters ligiert. Dieser diente dazu, die Ligatur nach der geplanten Ischämiezeit wieder zu entfernen, ohne das Herzgewebe zu verletzen. Das plötzliche Erblassen des Versorgungsgebiets der LAD apikal der Ligaturstelle diente als Erfolgskontrolle.

Die Spannfäden zur Spreizung des Zwischenrippenspalts wurden daraufhin gelockert, die Thorakotomiestelle mit einer feuchten Mullkompressen (Noba Verbandmittel Danz, Wetter) bedeckt und für 60 min so belassen. Nach Ablauf der Zeit wurde der Ligaturfaden durchtrennt und Platzhalter und Knoten entfernt, sodass das zuvor ischämische Myokard wieder perfundiert wurde. Nach Entfernung der Haltefäden wurden die einzelnen Schichten wie folgt verschlossen: *Mm. intercostales* mit Einzelheften (5-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Medical Norderstedt), *Mm. pectorales* und *M. rectus thoracis* mit Einzelheften (7-0 Prolene), Haut fortlaufend (7-0 Prolene). Die Nähte an Hals und Thorax wurden mit einem in Iod getränkten Wattestäbchen desinfiziert.

Die Antagonisierung der Narkose erfolgte wie oben beschrieben durch subkutane Injektion der Antidota in die Kniefalte. Bis zur Wiederherstellung einer suffizienten Spontanatmung wurden die Tiere maschinell beatmet und erst nach Eintreten von Abwehrreaktionen extubiert und in einen beheizten Käfig gesetzt. Die postoperative Schmerzabdeckung erfolgte wie oben beschrieben.

4. Positron-Emissions-Tomographie (PET)

Die Positron-Emissions-Tomographie (PET) ist eine nicht-invasive, hochauflösende, nuklearmedizinische Methode, die zur gleichzeitigen Bestimmung der myokardialen Vitalität, des metabolischen Volumens sowie systolischer und diastolischer Funktionsparameter über den Verlauf der Infarktheilung genutzt werden kann (180). Die Messungen und Auswertung wurden in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Großhadern durchgeführt.

4.1. Prinzip der Positron-Emissions-Tomographie

In der nuklearmedizinischen Bildgebung werden meist radioaktiv markierte Pharmaka, so genannte Tracer benutzt. Diese Radiotracer ähneln von ihrer Strukturformel natürlich vorkommenden Molekülen, die entsprechend in den normalen Stoffwechsel eingebaut und deren Zerfall nachgewiesen werden kann. In der vorliegenden Studie wurde der weit verbreitete und validierte Tracer ^{18}F -fluorodesoxyglukose (^{18}FDG) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Glukoseanalogon, bei dem die erste OH-Gruppe durch ein radioaktives Fluorisotop ersetzt wurde. Herzmuskelzellen gewinnen ihre Energie aus Fettsäuren- und Glukosestoffwechsel. So wird das ^{18}FDG über Glukosetransporter in die Kardiomyozyten aufgenommen und phosphoryliert. Die phosphorylierte Form kann im Gegensatz zu Glukose nicht weiter verstoffwechselt werden, sodass die Menge an aufgenommenem ^{18}FDG -6-Phosphat als proportional zur gesamten Stoffwechselrate der Zelle gesehen werden kann. Beim radioaktiven Zerfall werden Positronen emittiert, deren Zusammenstoß mit Elektronen zur Freisetzung von zwei hochenergetischen Photonen führt, die von den Detektoren des PET-Scanners detektiert werden. (181)

4.2. Durchführung

Die PET-Scans wurden an Tag 6 und Tag 30 nach Infarkt mit einem speziellen Kleintier PET-Scanner (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens Healthcare Molecular Imaging, Knoxville, TN, USA) durchgeführt. Die Anästhesie wurde mit 2,5 % Isofluran eingeleitet und mit 1,5 % aufrechterhalten. Über einen Schwanzvenenkatheter wurden 100 μl vom Tracer injiziert und mit 50 μl Kochsalzlösung nachgespült. Zur Messung wurden die Tiere gestreckt in die vorgesehene Öffnung im Tomographen gelegt. Die Körpertemperatur wurde über

eine an ein Rektalthermometer gekoppelte Wärmematte geregelt. EKG-Elektroden für Neugeborene (3M, St. Paul, MN, USA) wurden an beiden Vorderpfoten und an der linken Hinterpfote befestigt.

4.3. Auswertung

Die Prozessierung und Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Inveon Acquisition Workplace (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) durchgeführt. Die linksventrikulären Funktionsparameter wurde mit der Software QGS (Cedars-Sinai, Los Angeles, CA, USA) bestimmt.

4.4. Infarktgröße/ Totales Perfusionsdefekt (TPD)

Die Infarktgröße ist der entscheidendste Faktor für die Infarktheilung, das kardiale Remodeling und das Langzeitüberleben eines Patienten (182). Die Tracer-Anreicherung im PET ermöglicht Rückschlüsse auf die Zellvitalität und Stoffwechselrate im Myokard. Das gesunde Myokardgewebe hat einen physiologischen Glukosestoffwechsel, was in einer einheitlichen Tracer-Anreicherung sichtbar ist. Im Gegensatz dazu zeigt das Infarktgebiet eine verminderte Tracer-Aufnahme und damit Stoffwechsellaage. Daraus kann das Auswerteprogramm das Infarktgebiet und die Infarktgröße berechnen. (181)

Das Perfusionsdefizit kann segmental oder total bestimmt werden. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Infarktgröße anhand des totalen Perfusionsdefizit (TPD) bestimmt. Das TPD bemisst das Ausmaß und die Schwere der Hypoperfusion bezogen auf das gesamte Myokardvolumen (183). Die PET-Untersuchung ist die sensitivste Methode zur Beurteilung der myokardialen Vitalität und wird daher als Goldstandard angesehen (184).

4.5. Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)

Die PET-Untersuchung kann ebenso dazu genutzt werden, systolische und diastolische Funktionsparameter zu untersuchen (185).

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) berechnet sich aus dem Schlagvolumen (SV) geteilt durch das enddiastolische Volumen. Es stellt einen wichtigen Funktionsparameter für die linksventrikuläre Kontraktionsleistung dar. Physiologische Werte bei der Maus variieren stark je nach Messmethode und Anästhesie und liegen um die 60-75 %. (186)

4.6. Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV)

Das enddiastolische Volumen ist das maximale Füllungsvolumen eines Ventrikels am Ende der Diastole. Ein Anstieg des enddiastolischen Volumens spricht für eine ausgeprägtere Ventrikeldilatation und damit für ein verstärktes maladaptives Remodeling. Das LVEDV ist ebenso wie die Ejektionsfraktion ein wichtiger prognostischer Faktor für das Langzeitüberleben nach einem Herzinfarkt (187).

4.7. Linksventrikuläres metabolisches Volumen (LVMV)

Das linksventrikuläre metabolische Volumen korreliert stark mit der Zunahme an Herzmuskelmasse, sowie mit dem Volumen an fibrotischem Gewebe. Daher kann es als Parameter zur Bestimmung der myokardialen Hypertrophie und des Ausmaßes an kardialer Fibrose gewertet werden (188).

Im Programm Inveon Acquisition Workplace wurde ein Kubus um das gesamte Herz gezogen und die metabolische Aktivität innerhalb dieses Kubus mit einem Schwellenwert von 30 % der heißesten Voxel berechnet. Die korrekte Position des Kubus wurde in der axialen, sagittalen und koronaren Projektion verifiziert. Als Referenzwerte wurden Messungen mit einer festgelegten Anzahl an Voxel in Gehirn, Leber und Skelettmuskulatur durchgeführt.

5. Probennahme für Histologie und Durchflusszytometrie

5.1. Kardiale Blutgewinnung

Für die kardiale Blutentnahme wurden die Tiere mittels Isofluran-Inhalationsnarkose narkotisiert und mit Klebestreifen auf dem Rücken liegend fixiert. Der Thorax wurde in Höhe des zweiten Interkostalraums eröffnet und das Herz dargestellt. Mit einer zuvor heparinisierten (Heparin- Natrium- 25.000, ratiopharm GmbH, Ulm) 2 ml Spritze (BD Discardit II Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einer 27 G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) wurde das Herz in Höhe des zweiten Interkostalraums im 45° Winkel punktiert und vorsichtig aspiriert. Durch geringfügige Lage- und Winkelveränderung der Kanüle konnte die Blutmenge erhöht werden.

Das Blut wurde abhängig von seinem jeweiligen Verwendungszweck abzentrifugiert und das Serum eingefroren oder direkt für die Durchflusszytometrie verwendet.

5.2. Entnahme und Verarbeitung der Herzen

Ohne Zeitverzug wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Thorax und Abdomen mit einer Schere großzügig eröffnet. Um das Spülen des Herzens zu vereinfachen, wurde die Leber inzidiert. Anschließend wurde das Herz durch Punktion des linken Ventrikels mit einer 10 ml PBS-Spritze durchspült, um das Blut zu entfernen. Mit Pinzette und Mikroschere wurde das Herz vorsichtig herauspräpariert, die zu- und abführenden Gefäße durchtrennt und durch die großen Gefäße erneut mit PBS gespült.

Für die histologische Untersuchung wurden die Herzen für 30 min in einer 4 %-igen PFA-Lösung (16 % Formaldehyde Solution, Methanol-free, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA, 1:4 verdünnt) fixiert und danach über Nacht in 30 %-iger Sucrose/PBS-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert. Diese Inkubation in Sucroselösung ist notwendig, da bei Gefrierschnitten sonst Eiskristalle entstehen.

Die Herzen wurden anschließend in einer Schneidevorrichtung fixiert und mit einer Rasierklinge in der Transversalebene in drei ca. 2 mm breite Scheiben (Basis, Mittelteil, Apex) geschnitten. Im Folgenden werden die Basis als Ebene 1, der Mittelteil als Ebene 2 und die Herzspitze, in der der Infarkt hauptsächlich lokalisiert ist, als Ebene 3 bezeichnet. Die Ebenen werden einzeln auf der Anschnittfläche in Kryoeinbettformen (Tissue-Tek Cryomold 25 x 20 x 5 mm, Sakura Finetek) gelegt, mit dem Einbettmedium (Tissue Tec O-C-TTM Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) bedeckt und auf Trockeneis gefroren. Bis zum Schneiden wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

6. Histologie

6.1. Anfertigung der Gefrierschnitte

Das Präparat wurde mit Einbettmedium auf dem Stempel des Kryotoms (CryoStar NX70, Thermo Fisher Scientific) befestigt und in die Vorrichtung gespannt. Die Temperatur der Klinge betrug -25 °C, die des Präparates -18 °C.

Aus jeder Ebene wurden nun fünf 8 µm Schnitte erstellt und auf die obere Hälfte eines Objektträgers (Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) überführt. Um mehrere Schichten des Gewebes zu untersuchen und eine größere Repräsentativität zu erreichen, wurde nach den ersten fünf

Schnitten ein 50 µm Trimschnitt gemacht und weitere fünf Schnitte angefertigt, die auf den unteren Teil der Objektträger überführt wurden. Unter Berücksichtigung von verworfenen fehlerhaften Schnitten beträgt der Abstand der zwei Schnitte auf einem Objektträger ungefähr 120 µm in der Transversalebene des Herzens.

6.2. Prinzip der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine gebräuchliche Methode zur Darstellung, Lokalisierung und Quantifizierung bestimmter Oberflächenantigene *in situ* in Gewebeschnitten unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Antikörper. Das Prinzip beruht auf einer spezifischen Antikörper-Bindung an bestimmte Epitope, die entweder direkt durch Kopplung des Fluorochroms an den Primärantikörper oder indirekt durch Kopplung an einen Sekundärantikörper unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden kann.

6.3. Durchführung

Alle immunhistochemischen Färbungen folgten einem ähnlichen Protokoll und unterschieden sich nur in der Verwendung verschiedener Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Inkubationszeit.

Zuerst wurden die Schnitte mit 4 %-iger PFA-Lösung (Thermo Fisher) für 10 min fixiert und anschließend in einer Waschlösung einer Plastikkuvette 3 x 5 min auf einem Linearschüttler (Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach) gewaschen. Die Waschlösung bestand aus PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 0,01M Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄), pH7.2 (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, Steinheim), 0,1% (V/V) Tween20 (Tween20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 5 g BSA (Albumin Fraktion V, Roth, Karlsruhe).

Danach wurden die Schnitte kurz trocknen gelassen und mit einem Fettstift (Liquid Blocker, Science Service, Japan) umrandet. Gegen unspezifische Bindungen wurde auf jeden Schnitt 100 µl Blocklösung pipettiert. Dieser und alle folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten, lichtundurchlässigen Färbewanne durchgeführt. Für die Herstellung der Blocklösung wurden 50 ml der Waschlösung entnommen und dieser 0,5 % Saponin (Sigma-Aldrich) hinzugefügt, das der Permeabilisierung der Zellmembran dient. Aus der daraus entstehenden sogenannten Stocklösung, die der späteren Inkubation des Sekundärantikörpers

diente, wurden wiederum 4,5 ml entnommen und mit 0,5 ml 100 % *goat serum* versetzt, sodass man eine Blocklösung mit 10 % *goat serum* erhielt.

Nach einer Stunde wurde die Blocklösung abgeklopft und je 50 µl Primärantikörper, in Blocklösung verdünnt, auf jeden Schnitt aufgetragen. Die Verdünnungen und Inkubationszeiten der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind der Abbildung 8 zu entnehmen.

Um die ungebundenen Antikörper abzuwaschen, folgte ein Waschschrift. Danach wurden 50 µl 1:200 in Stocklösung verdünnter Sekundärantikörper für eine Stunde aufgetragen. Der *Host* des Sekundärantikörpers sollte mit dem Serum, mit dem die Blocklösung hergestellt wurde, in diesem Fall *goat*, übereinstimmen. Als nächstes wurde der Sekundärantikörper abgeklopft und für weitere 5 min der Kernfarbstoff HOECHST (HOECHST 33342, invitrogen, Thermo Fisher), 1:1000 in Stocklösung verdünnt auf die Schnitte gegeben.

Darauf folgte ein weiterer Waschschrift, bevor die Schnitte mit einem Tropfen Eindeckmedium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako North America Inc., USA) benetzt und mit einem Deckgläschen (Menzel Gläser, Thermo Scientific) versehen wurden. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C getrocknet und bis zur Auswertung bei -20°C gelagert.

6.4. Auswahl der Antikörper

Zur Markierung der eosinophilen Granulozyten wurde ein polyklonaler *rabbit*-Antikörper gegen die eosinophile Peroxidase, EPX oder EPO, verwendet. Dabei handelt es sich um ein Eosinophilen-spezifisches Protein, das als Bestandteil der sekundären Granula der Abwehr gegen Bakterien und Parasiten dient. Um sicherzugehen, dass es sich um eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung handelt, wurde ein *rabbit*-IgG als Isotyp-Kontrolle in derselben Konzentration wie der Primärantikörper verwendet.

Für die Färbung des Gefäßendothels wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen das *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*, auch PECAM1 oder CD31 (cluster of differentiation) genannt, benutzt. CD31 ist ein Membranprotein, das konstitutiv auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Besonders an interzellulären Verbindungen sitzend, ist das Protein unter anderem an der Transmigration von Leukozyten, der

Mausstamm	Struktur	Primärantikörper Klon Hersteller	Konzentration/ Verdünnung	Inkubations- zeit	Sekundärantikörper Fluorochrom Hersteller	Verdünnung	Inkubations- zeit
C57BL6J	Eosinophile	EPX rabbit anti-mouse Polyklonal Biorbyt	0,5 mg/ml 1:100	18h	Goat anti-rabbit AlexaFluor 594 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
	Isotyp- Kontrolle	Rabbit IgG Agilent Dako	15g/l 1:3000	18h	Goat anti-rabbit AlexaFluor 594 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
	Fibrose				Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 647 Conjugate, invitrogen	1:100	1h
	Nukleus				HOECHST 33342 invitrogen, ThermoFisher	1:1000	5 min
Balb/c Δ dblGata1	Gefäßendothel	CD31 rat anti-mouse MEC 13.3 BD Biosciences	15,625 µg/ml 1:50	2h	Goat anti-rat AlexaFluor 488 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
	Isotyp- Kontrolle	Rat IgG2a kappa Isotype Control eBioscience	0,5 mg/ml 1:1666	2h	Goat anti-rat AlexaFluor 488 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
	Fibrose				Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 647 Conjugate, invitrogen	1:100	1h
	Nukleus				HOECHST 33342 invitrogen, ThermoFisher	1:1000	5 min
Balb/c Δ dblGata1	Makrophagen	CD68 rat anti-mouse Klon FA-11 Bio-Rad	1,0 mg/ml 1:100	2h	Goat anti-rabbit AlexaFluor 594 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
	Isotyp- Kontrolle	Rat IgG2a eBioscience	0,5 mg/ml 1:50	2h	Goat anti-rabbit AlexaFluor 594 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
	Fibrose				Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 647 Conjugate, invitrogen	1:100	1h
	Nukleus				HOECHST 33342 invitrogen, ThermoFisher	1:1000	5 min

Abbildung 8: Antikörper, Konzentrationen und Inkubationszeiten

Mechanotransduktion und an der Steuerung der Gefäßpermeabilität beteiligt. Es wird außerdem auf einigen peripheren Leukozyten, Blutplättchen und Stammzellen exprimiert (189). Als Isotyp- Kontrolle wurde Rat IgG2a kappa in der entsprechenden Verdünnung appliziert.

Das Transmembran-Glykoprotein CD68 beim Menschen entspricht dem homologen Protein Macrosialin in der Maus und ist ein Zelladhäsionsprotein aus der Familie der LAMP-Proteine. Es wird auf den intrazellulären Lysosomen von Gewebsmakrophagen, Monozyten und deren Tochterzellen exprimiert und dient daher als Pan-Makrophagen Marker (190, 191). Rat IgG2a kappa wurde als Isotyp-Kontrolle verwendet.

Zur Quantifizierung der Fibrose wurde das Lektin Wheat germ agglutinin (WGA) verwendet, das bereits an das Fluorochrom Alexa Fluor 647 gekoppelt ist. WGA bindet selektiv an Sialinsäure- und N-Acetylglucosamin-Reste, beides Bestandteile der extrazellulären Matrix, und färbt so fibrotisches Gewebe an. (192)

HOECHST 33342 (2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-Methyl-1-Piperazinyl]-2,5'-bi-1H-Benzimidazol-Trihydrochlorid-Trihydrat) ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung der Zellkerne fixierter oder lebender Zellen. Nach Bindung an doppelsträngige DNA fluoresziert HOECHST blau, wenn es von ultraviolettem Licht angeregt wird.

6.5. Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie basiert auf einem dreistufigen Prozess, in dem ein Elektron des Fluorochroms durch die Absorption eines Photons einer Lichtquelle in einen höheren Energiezustand versetzt wird (Exzitation) und aus diesem sehr instabilen Zustand nach einer Konformationsänderung wieder in den Ursprungszustand zurückfällt. Die Energiedifferenz zwischen den Energiezuständen wird in Form von Lichtenergie längerer Wellenlänge freigegeben und vom Mikroskop detektiert (Emission). Dieser Exzitations-Emissions-Kreislauf kann mehrere tausend Male wiederholt werden.

Der größte Vorteil im Vergleich zur Enzym-gekoppelter Immunhistochemie ist die Fülle an Fluorochromen. Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat ein definiertes Wellenlängenspektrum mit Absorptionsmaximum, in dem er angeregt wird, und

ein entsprechend längerwelliges Spektrum mit Emissionsmaximum, in dem die Energie abgestrahlt wird. Bei einer Mehrfachfärbung ist unbedingt darauf zu achten, dass sie sich die Spektren der verwendeten Fluorochrome möglichst wenig überlagern.

Für die Auswertung der histologischen Schnitte wurde ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Jena) verwendet, ein sogenanntes Epifluoreszenzmikroskop. Die Lichtquelle entsendet einen Lichtstrahl, dessen Spektrum durch einen Anregungsfilter so gefiltert wird, dass nur das Licht mit der notwendigen Wellenlänge zur Anregung des entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffs durchgelassen wird. Über den Strahlteiler gespiegelt gelangt das Licht über das Objektiv auf das Präparat, das gleichzeitig als Kondensor fungiert. Die entstehende Fluoreszenz wird vom Objektiv gesammelt und gelangt über Filter zum Okular beziehungsweise zur Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss, Jena).

6.6. Auswertung

Für alle Aufnahmen wurde das Epifluoreszenzmikroskop Axio Imager.M2 von Carl Zeiss, Jena verwendet. Die Einstellungen und Belichtungszeiten wurden pro Kanal zu Beginn festgesetzt und so belassen, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die CD68⁺-Zellen wurden mit der ZEN Imaging Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) ausgezählt und die WGA- und CD31-positiven Flächen mit AxioVision (Carl Zeiss) berechnet. Die Primärvergrößerung betrug in den meisten Fällen 40x, mit einer weiteren Tubusvergrößerung von 10x. Eine 400x-Vergrößerung entspricht 318 x 238µm.

Zur Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten wurden von Wildtyp-Tieren an Tag 0, Tag 2, Tag 6 und Tag 30 Schnitte angefertigt, nach dem obenstehenden Protokoll gefärbt und jeweils fünf 40x-Vergrößerungen aus dem Infarktbereich pro Schnitt abfotografiert und die EPX-positiven Zellen ausgezählt.

Die CD68-positiven Makrophagen wurden an Tag 30 in den Balb/c- und den Δ dblGata1-Mäusen ausgezählt. Dazu wurden pro Tier jeweils fünf repräsentative Aufnahmen aus dem Infarktbereich und dem Perinfarktbereich angefertigt.

Um zu analysieren, ob die Eosinophilen einen Einfluss auf die (Re)Vaskularisierung des Infarktgebietes haben, wurden jeweils sechs 40x-

Vergrößerungen aus dem Periinfarktgebiet von Tag 30 Herzen beider Gruppen mit dem Mikroskop abfotografiert. Die Gefäßdichte wurde anhand der CD31-positiven Areale mit AxioVision ausgewertet. Dazu wurde anhand des Histogramms ein Minimalwert für die Signalintensität für alle Aufnahmen festgelegt und mit diesem die Fläche und die Anzahl der CD31-positiven Areale berechnet. Zur Klärung der Frage, ob die eosinophilen Granulozyten das kardiale Remodeling über die Fibrosebildung beeinflussen, wurden je zwei Schnitte aus Ebene 2 und Ebene 3 angefertigt, die jeweils mindestens 100 µm voneinander entfernt lagen. Diese Schnitte wurden mit WGA647 gefärbt. Es wurden Mosaik-Übersichtsaufnahmen von der gesamten Schnittfläche angefertigt und mit der Flächenberechnungsfunktion von AxioVision ausgewertet. Dabei wurde ähnlich wie bei der Berechnung der Gefäßdichte eine Minimalintensität festgelegt und auf alle Schnitte angewendet. Zur Berechnung des Verhältnisses der Fibrosefläche zur Gesamtfläche des Herzens wurde die Herzfläche und die ausgemessen, davon die Fläche der Ventrikellumina subtrahiert und dazu der errechnete Wert für die WGA-positive Fläche in Relation gesetzt.

$$\text{Fibrosefläche (\%)} = \frac{\text{Fläche WGA positiver Areale}}{\text{Herzkontur} - \text{Lumenfläche}}$$

7. Zytokinarray

Um einen Überblick über die Proteinexpression während des Remodeling-Prozesses zu erhalten und damit mögliche Zytokine zu identifizieren, die die Unterschiede im Phänotyp zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen erklären, wurde ein Zytokinarray (Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array, R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA) durchgeführt.

7.1. Prinzip

Dabei handelt es sich um einen Membran-basierten Multiplex-Sandwich-Immunoassay, mit dem man 111 Cytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und andere lösliche Proteine gleichzeitig messen kann. Das Prinzip basiert auf spezifischen, auf einer Nitrocellulose-Membran gekoppelten Fangantikörpern, die Zielproteine aus dem Zelllysate binden. Das Zielprotein wird durch Bindung eines zweiten, Biotin-konjugierten Antikörpers, der gegen ein anderes Epitop als der Fangantikörper gerichtet ist, detektiert (s. Abbildung 9). Mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase und einer Chemilumineszenz-Reagenz wird die Bindung

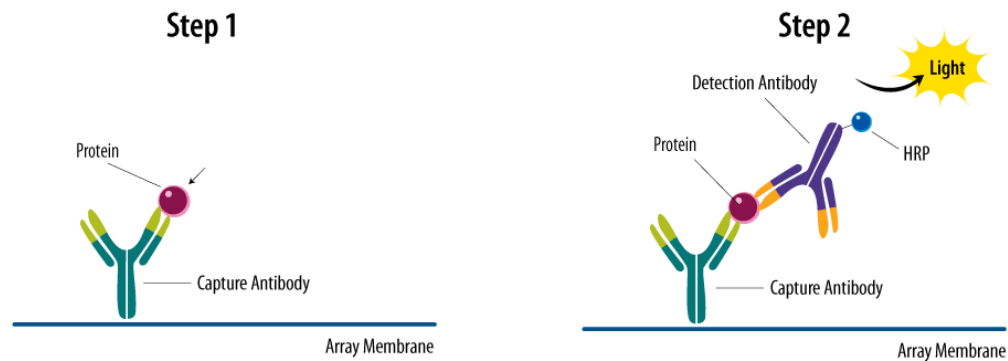


Abbildung 9: Prinzip des Zytokinarrays

Mit freundlicher Genehmigung von Bio-Techne, Copyright © 2019 (193)

sichtbar gemacht. Die Intensität des daraus entstandenen Signals auf dem Röntgenfilm korreliert mit der Menge an gebundenem Protein.

7.2. Durchführung

Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der kardialen Zytokinexpression nach einem Myokardinfarkt gibt, wurden die Herzen von 4 Knockout- und 8 Wildtyp-Tieren an Tag 6 nach Infarkt analysiert (193). Dazu wurden die Herzen halbiert und nur der apikale Teil mit dem Infarktgebiet verwendet. Die Herzhälften wurden in gekühltem RIPA Puffer (Pierce RIPA Buffer, ThermoFisher) unter Hinzugabe von Protease-Inhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Kit, ThermoFisher) und EDTA lysiert und mit einem Homogenisator (IKA Ultra-Turrax TP18-10 Homogenisierer, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Der Zelldebris wurde für 15 min bei 10.000 G und 4 °C abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde mit einem kommerziellen Proteinassay (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher) photometrisch bestimmt und die Proben entsprechend in RIPA Puffer verdünnt, um auf jeder Membran dieselbe Proteinmenge zu erhalten.

Die Membranen wurden mithilfe einer Pinzette in das dafür vorgesehene 4-Well Multi-dish gelegt und mit 2 ml Block Puffer (Array Puffer 6) benetzt und für 1 h auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Schüttler. 300 µl-500 µl der verdünnten Probe wurden mit 500 µl Array Puffer 4 vermischt und durch Hinzugabe von Array Puffer 6 auf ein Volumen von 1,5 ml gebracht. Nach 1 h wurde die Blocklösung von den Membranen abgegossen, die Proben auf die einzelnen Membranen verbracht und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Um die ungebundenen Bestandteile zu entfernen, wurden die Membranen in separate Plastikschalen gegeben und 3x10 min mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Währenddessen wurden pro Well 30 µl Detektionsantikörper-Cocktail in 1,5 ml Array Puffer 4/6 gelöst und je 1,5 ml in jedes Well pipettiert. Nach dem Waschen wurden die Membranen zurück in das 4-Well Multi-dish überführt und mit dem Biotin-markierten Detektionsantikörper für 1 h inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff wie oben beschrieben. Anschließend wurden pro Well 2 ml Streptavidin-HRP-Lösung auf die Membranen gegeben und für 30 min inkubiert. Das Streptavidin bindet nun an das Biotin und die kovalent konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP) stellt die Enzymaktivität für die anschließende Erkennung mit dem Chemireagenz.

Nach einem weiteren Waschschriff wurde je 1 ml Chemireagenz Mix für 1 min auf jede Membran gegeben und anschließend mit einer Schutzfolie bedeckt. Das übermäßige Reagenz wurde mithilfe von Papiertüchern herausgedrückt und die Membranen ohne Zeitverzug in der Autoradiographie-Kassette platziert. Die Membranen wurden im Entwickler für 1, 5, 10 und 20 min entwickelt. Die unterschiedlichen Belichtungszeiten erleichterten die anschließende Auswertung.

7.3. Auswertung

Die Radiographie-Folien wurden eingescannt und mit Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) ausgewertet. Mit Hilfe der transparenten Schablone konnten die Spots den entsprechenden Analyten zugeordnet werden. Die Signalstärke entsprach der Pixeldichte, die mit Hilfe eines Messrahmens berechnet wird (s. Abbildung 10). Die drei Positivkontrollspot-Paare an den Ecken der Membran dienten als Referenzpunkte, aus denen ein Korrekturfaktor für die jeweilige Membran berechnet wurde. Die Negativkontrollpunkte dienten als Korrekturwert für den Hintergrund. Je zwei Spots repräsentieren ein Protein, da jeder Fangantikörper an zwei Punkten an die Membran gebunden ist. Folglich

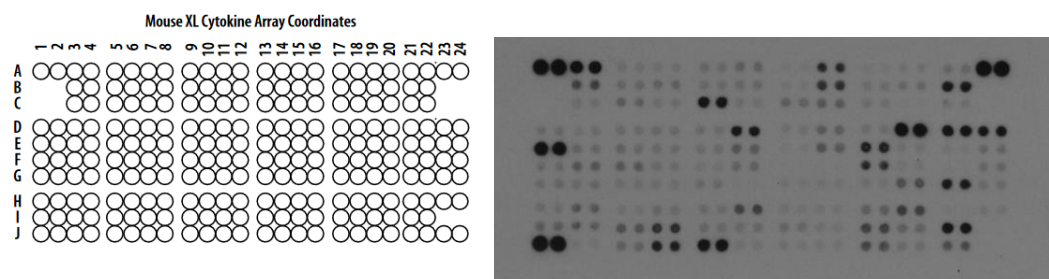


Abbildung 10: Exemplarische Radiographie-Folie einer Balb/c Maus

wurde der Mittelwert aus den zwei benachbarten Spots berechnet und in die Statistik einfließen gelassen. Der Großteil der Auswertung wurde an der Folie mit 10 min Belichtungszeit durchgeführt. Nur wenn ein Spot in dieser Folie zu schwach oder zu stark belichtet war, wurde die Messung an Folien mit kürzerer oder längerer Belichtung durchgeführt.

8. Durchflusszytometrische Untersuchungen (Fluorescence-activated cell scanning, FACS)

8.1. Prinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Analyse der Größe, der relativen Granularität und der relativen Fluoreszenzintensität einer Zelle durch ein Kopplungssystem aus Optik und Elektronik. Die Zellen werden in einen Flüssigkeitsstrom gesogen und durch eine Quarzküvette vereinzelt. So strömen sie an verschiedenen Lasern vorbei und werden angeregt. Das entstehende Streulicht bzw. die Fluoreszenz werden von Linsen gebündelt und über verschiedene Filter von Detektoren erfasst. Die Detektoren wandeln dann das optische in ein elektrisches Signal um.

Die Lichtstreuung hängt von der Größe und der Granularität der Zellen ab. Die Vorwärtsstreuung (*Forward-scattered light*, FSC) misst die Beugung der Lichtstrahlen, die beim Auftreffen auf die Zelle abgelenkt werden, und ist daher proportional zur Zellgröße. Die Seitwärtsstreuung (*Side-scattered light*, SSC) misst die gebrochenen und reflektierten Strahlen, die entstehen, wenn ein Lichtstrahl auf den Zellkern oder granuläre Komponenten im Zellinnern trifft. Diese Strahlen werden im 90°-Winkel abgelenkt und in einer Linse gebündelt.

Die SSC verhält sich proportional zur Granularität einer Zelle. Mit diesen zwei Parametern lassen sich Zellen schon anhand ihrer Größe und inneren Komplexität einteilen. Eine Möglichkeit zur weiteren Differenzierung von Zellen und ihren Subpopulationen ist die Verwendung Fluorochrom-gekoppelter monoklonaler Antikörper. Das Prinzip der Fluoreszenz funktioniert so wie in der Fluoreszenzmikroskopie (IV.6.2).

Um die Überlappung der Farbspektren der einzelnen Fluorochrome zu berücksichtigen, wurde das Gerät mit sogenannten Beads (Anti-Mouse/Anti-Rat Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set, Becton Dickson and

Company, Franklin Lakes, USA) und einer ungefärbten Probe als Negativkontrolle kompensiert.

Eine Übersicht der verwendeten Fluorochrome und Antikörper ist der Tabelle 1 zu entnehmen:

8.2. Übersicht verwendeter Antikörper

Oberflächen-antigen	Klon	Fluoro-chrom	Firma	Funktion
Herz				
CD45	30-F11	PerCP 5.5	BioLegend	Panleukozyten-Marker
CD64	10.1	APC	Biolegend	Unterscheidung Monozyten/Makropagen
F4/80	BM8	BV421	BioLegend	Makrophagen-Marker
Ly6G	1A8	FITC	BioLegend	Granulozyten-Marker
Ly6C	HK 1.4	BV510	BioLegend	Makrophagen-Subpopulationen
Siglec-F	E50-2440	APC Cy7	BD Pharmingen	Eosinophile
CD11c	HL3	PE	BD Pharmingen	Ausschluss dendritischer Zellen
TCR	H57-597	PE	BioLegend	Ausschluss T-Zellen
Ter119	Ter-119	PE	BioLegend	Ausschluss Erythrozyten
Nk 1.1	PK135	PE	BioLegend	Ausschluss Natürliche Killerzellen
Live/Dead	SYTOX Red	PE	BioLegend	Ausschluss tote Zellen
Blut				
CD45	30-F11	PerCP 5.5	BioLegend	Panleukozyten-Marker
CD115	APS98	BV421	BioLegend	Monozyten-Marker
Ly6G	1A8	FITC	BioLegend	Granulozyten-Marker
Ly6C	HK 1.4	BV510	BioLegend	Monozyten-Subpopulationen
Siglec-F	E50-2440	APC Cy7	BD Pharmingen	Eosinophile
CD11c	HL3	PE	BD Pharmingen	Ausschluss dendritischer Zellen
TCR	H57-597	PE	BioLegend	Ausschluss T-Zellen
Ter119	Ter-119	PE	BioLegend	Ausschluss Erythrozyten
Nk 1.1	PK135	PE	BioLegend	Ausschluss Natürlicher Killerzellen
Live/Dead	SYTOX Red	PE	ThermoFisher	Ausschluss toter Zellen

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper in Blut und Herz

8.3. Durchführung

8.3.1. Vorbereitung des Blutes

Das Blut wurde wie in 5.1 beschrieben durch eine heparinisierte Spritze intrakardial entnommen. Um eine vergleichbare Anzahl an Zellen auswerten zu können, wurden jeweils 100 µl Blut pro Tier verwendet. Die Zellsuspension wurde für 5 min in 3 ml Ammoniumchlorid inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Um die Leukozyten nicht zu schädigen, wurde vor der Zentrifugation 3 ml PBS hinzugegeben. Dieser und alle weiteren Zentrifugationsschritte fanden für 5 min bei 4 °C und 350 G statt. Der Überstand wurde abgesogen und das Pellet in 50 µl Fc-Block (Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32, BD Pharmingen) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Well einer 96-Well-Platte (Non-Tissue Culture Treated Plate, 96 Well, U-Bottom with Low Evaporation Lid, Falcon) überführt und 50 µl des Antikörper-Mastermix hinzugegeben. So wurden die Zellen für 15 min im Kühlschrank inkubiert und anschließend wie gewohnt zentrifugiert. Der Überstand mit den ungebundenen Antikörpern wurde abgeklopft und das Pellet in 200 µl resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und wie alle weiteren Proben mit dem Cell Analyzer BD LSR Fortessa (Franklin Lakes, NJ, USA) gemessen.

8.3.2. Vorbereitung der Herzen

Die Herzen wurden wie in 5.2 beschrieben entnommen, mit PBS gespült und bis zur weiteren Verarbeitung in eisgekühltes PBS gelegt. Die Herzen wurden in horizontaler Ebene halbiert und so in Infarkt- und Remotezone geteilt. Im ersten Schritt wurden die Herzen in einer kleinen Petrischale (TC-Schale 35, Standard, Sarstedt, Nümbrecht) mithilfe einer Pinzette und eines Einmal-Skalpells (Einmal-Sicherheitsklingen, Aesculap AG, Tuttlingen) zerkleinert. Das zerkleinerte Herz wurde in ein mit 6 ml Kollagenase-Mix gefülltes 50 ml Falcon überführt und für 30 min bei 400 rpm im Thermomixer (Thermomixer comfort, eppendorf, Hamburg) mit einem speziellen Aufsatz für 50 ml Reaktionsgefäße inkubiert. Der Kollagenase-Mix bestand aus Kollagenase 1, Kollagenase 11, Hyaluronidase und DNase 1 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) und dient dem schonenden Herauslösen der Zellen aus dem Gewebeverband. Mit dem Stempel einer 2 ml Spritze wurden die angedauten Herzen durch ein 70 µm-Filtersieb (70 µm Nylon Cell strainer, Corning, NY, USA) gedrückt, in 6 ml FACS Puffer aufgefangen, bei

4 °C 350 G zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das erhaltene Pellet wurde in 150 µl Fc-Block resuspendiert. Je 50 µl der Zellsuspension pro Well wurden auf eine unbehandelten 96-Well-Platte aufgebracht und je 50 µl des Antikörper-Mastermix hinzugegeben. So wurden die Zellen für 20 min im Kühlschrank inkubiert, nach Zugabe von je 100 µl FACS-Puffer zentrifugiert, abgesaugt und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Kurz vor der Messung wurde 1 µl des Live/Dead-Markers (SYTOX Red dead Cell Stain, ThermoFisher) hinzugegeben, die Zellen durch einen 50 µm-Filter (Cell Trics 50 µm, Sysmex Partec, Görlitz) gegeben und gemessen.

8.4. Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo (Version 10.6.1, Ashland, OR, USA). Die angewandte Gating-Strategie ist der Abbildung 11 zu entnehmen.

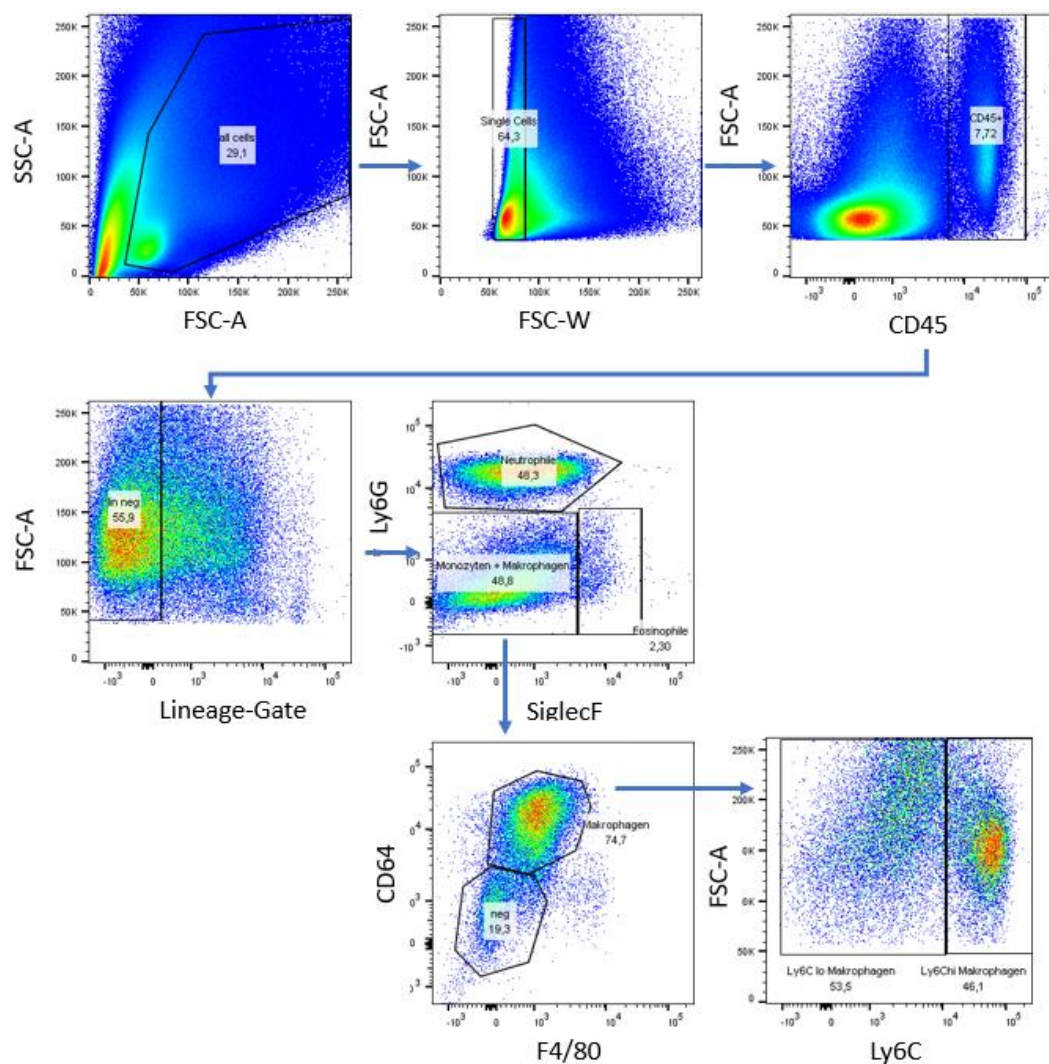


Abbildung 11: Visualisierung der angewandten Gating-Strategie

Zuerst wurden im FSC-A/SSC-A die Zellen nach Größe und Granularität eingegrenzt. Unter Zuhilfenahme des FSC-W wurden Zell-Multiplets ausgeschlossen und auf Einzelzellen gegatet.

Daraus wurden die CD45-positiven Zellen (PerCP 5.5) bestimmt. Mit dem sogenannten Lineage-Gate (PE) wurden ungewünschte Leukozyten-Populationen wie dendritische Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzelle sowie tote Zellen aufgrund der Bindung von PE-markierten Antikörpern gegen zelltypspezifische Oberflächenantigene ausgeschlossen.

Die Lineage-negativen Zellen wurden dann auf Basis ihrer Ly6G (FITC) und Siglec F (APC-Cy7) Expression aufgetrennt, um Neutrophile und Eosinophile zu quantifizieren. Aus der Ly6G und Siglec-F doppel-negativen Population wurden die Makrophagen mithilfe von CD64+ (APC) und F4/80 (BV421) bestimmt. Die Makrophagen wurden anhand ihrer Ly6C-Expression (BV510) weiter charakterisiert.

9. *In-vitro*-Experimente

Zur Klärung der Fragestellung, ob eosinophile Granulozyten einen Effekt auf die Polarisierung von Makrophagen haben und so womöglich die Infarktheilung beeinflussen, wurden Koinkubationsversuche durchgeführt.

9.1. Versuchsaufbau

9.2. Isolation humaner eosinophiler Granulozyten

Die Isolation der humanen eosinophilen Granulozyten lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: die Dichtegradientenzentrifugation des Vollblutes in einzelne Zellfraktionen, das indirekte magnetische Labeling und die immunomagnetische Separation (194). Beim vorliegenden Versuchsaufbau (Eosinophil Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) handelt sich um eine negative Selektion, das heißt alle Nicht-Eosinophilen werden über einen Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörper indirekt magnetisch markiert und beim Durchfluss durch eine magnetische Säule zurückgehalten, während die unberührten Eosinophilen ungehindert eluieren (195).

Dafür wurden einem gesunden Spender 40 ml Blut in 10 ml Zitrat-Röhrchen (S-Monovette, SARSTEDT AG & CO, Nümbrecht) abgenommen und in der

gleichen Menge PBS (Phosphate buffered saline, Thermo Fisher Scientific) mit 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim) verdünnt. Danach wurden in einem 50 ml Falcon (Falcon Round-Bottom Tube, Corning Incorporated Life Sciences, NY, USA) je 20 ml des verdünnten Bluts vorsichtig auf 20 ml Ficoll-Paque (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) geschichtet. Dabei ist darauf zu achten, das verdünnte Blut so langsam zu schichten, dass es zu keiner Durchmischung der Phasen kommt. Ficoll-Paque ist eine wässrige Lösung aus dem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer Ficoll, Amidotrizoesäure und Ethylendiamintetraessigsäure mit einer Dichte von 1.077 g/ml, deren Eigenschaften es ermöglichen, die Blutzellen nach ihrer Dichte aufzutrennen. (196)

Während der Zentrifugation (600 G, ohne Beschleunigung, ohne Bremse, 30 min) durchwandern die Zellen mit hoher Dichte (Erythrozyten, Eosinophile, Neutrophile) das Ficoll-Paque, während die Blutzellen mit geringerer Dichte (Mononukleäre Zellen, Basophile, Thrombozyten) sich in der Interphase zwischen Ficoll-Paque und der Plasmaschicht sammeln (s. Abbildung 12).

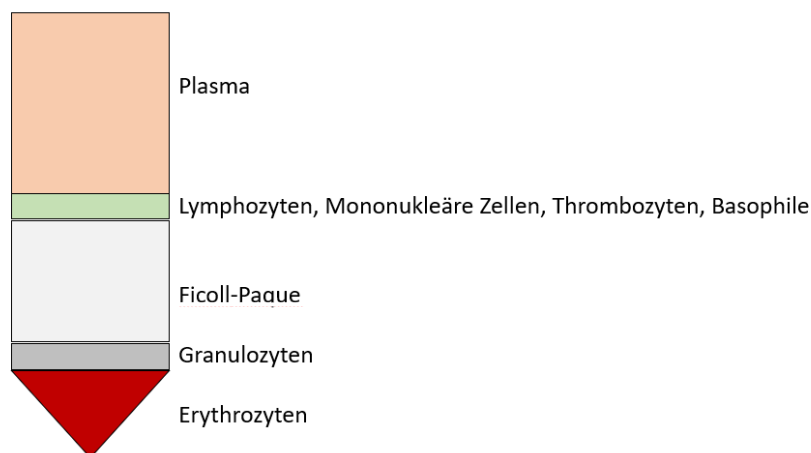


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Schichtung nach der Zentrifugation

Nach der Zentrifugation wurden die Plasmaschicht, die Interphase mit den mononukleären Zellen und das Ficoll-Paque vorsichtig abpipettiert, ohne das Zellpellet am Boden zu durchmischen. Dieses wurde mit Erythrozyten-Lyse-Puffer (Aqua dest. mit 1,5 M Ammoniumchlorid, 0,1 M Natriumhydrogencarbonat, 0,01 M EDTA, 1:10 in Aqua dest. verdünnt) resuspendiert, auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min inkubiert. In diesem Schritt macht man sich die osmotischen Eigenschaften des Ammoniumchlorids und des

destillierten Wassers zu Nutzen, die zum Einströmen von Wasser in die dünnwandigen Erythrozyten führen, die infolge dessen zerplatzen. Die Viabilität der Leukozyten wird kaum beeinträchtigt. Die Zellreste der Erythrozyten wurden durch einen Zentrifugationsschritt (300 G, 8 min), einen Waschschrift mit Puffer (PBS, 0,5 % BSA (Albumin Fraktion V, Roth, Pasching, Österreich), 2 mM EDTA) und einen weiteren Zentrifugationsschritt (300 G, 5 min) entfernt, sodass man ein Pellet erhielt, das nur noch neutrophile und eosinophile Granulozyten enthält. Nach der Erythrozytenlyse fanden alle weiteren Zentrifugationsschritte bei 4°C statt; alle Inkubationsschritte auf Eis oder im Kühlschrank bei 4°C.

Das Pellet wurde in 1 ml Puffer resuspendiert, um die Zellzahl zu bestimmen. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und mit 190 µl Tryptanblau vermischt. Davon werden wiederum 20 µl in eine verbesserte Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. In Abhängigkeit von der errechneten Zellzahl wurden die Mengen der Reagenzien für die folgenden Schritte berechnet. Die im Folgenden angegebenen Mengenangabe beziehen sich auf 10^7 Zellen. Bei einer höheren Zellzahl wurden die Mengen um das entsprechende Vielfache erhöht.

Die Zellsuspension wurde erneut bei 300 G für 10 min zentrifugiert. Für das magnetische Labeling wurde das entstandende Zellpellet in 40 µl Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert und mit 10 µl *Biotin-Antibody-Cocktail* für 10 min im Kühlschrank inkubiert. Der Biotin-markierte monoklonale Antikörper bindet nun an alle Nicht-Eosinophilen. Im nächsten Schritt wurden 30 µl Puffer und 20 µl *Anti-Biotin MicroBeads* hinzugegeben und für weitere 15 min im Kühlschrank inkubiert. Der an MicroBeads gekoppelte sekundäre Antikörper bindet nun an das Biotin und markiert damit alle Nicht-Eosinophilen indirekt magnetisch. Die Zellen werden anschließend mit 2 ml Puffer gewaschen und für 10 min bei 300 G zentrifugiert und anschließend in 500 µl Puffer resuspendiert.

Nun erfolgte die magnetische Separation: Dazu wurde eine mit Magnetkügelchen gefüllte Säule (LSColumn, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) in ein magnetisches Feld (MACS Separator, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) eingebracht und mit 3 ml Puffer gespült. Kurz bevor die Säule trocken fiel, wurde die Zellsuspension aufgebracht. Die Zellen durchliefen nun die magnetische Säule. Im Gegensatz zu den magnetisch gelabelten neutrophilen Granulozyten, die im Magnetfeld gehalten wurden, konnten die eosinophilen

Granulozyten die Säule ungehindert durchfließen. Die Säule wurde anschließend mit 3 x 3 ml Puffer gespült und der Efflux in einem 15 ml Falcon gesammelt. Die aufgereinigten Eosinophilen wurden bei 350 G 10 min abzentrifugiert.

9.3. Aktivierung eosinophiler Granulozyten

Die isolierten Eosinophilen wurde in 1 ml RPMI 1640 Medium (RPMI 1640 Medium, gibco, Thermo Fisher) mit 10 % fetalem Rinderserum und 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) resuspendiert und wie zuvor beschrieben ausgezählt. Mit einer Konzentration von 50.000 Zellen pro ml wurden je 2 ml der Zellsuspension in ein Well einer 12-Well-Platte gegeben. Da Eosinophile dazu tendieren, direkt nach der Isolierung refraktär auf Stimulantien zu reagieren, wurden sie für eine Stunde in den Inkubator verbracht. Nach 1 h wurden die Eosinophilen mit humanem IL-5 (50 ng/ml) und PAF (Plättchen-aktivierender Faktor, 5 µmol/L) aktiviert und damit für eine weitere Stunde inkubiert. PAF ist ein potenter Aktivator eosinophiler Granulozyten (197). Anschließend wurde die Zellsuspension aufgenommen, bei 350 G für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zum Koinkubationsversuch bei -80°C weggefroren.

9.4. Isolation humaner Monozyten

Die Isolation der humanen Monozyten funktioniert nach demselben Prinzip wie die der Eosinophilen. Zuerst erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque; mit dem Unterschied, dass sich Monozyten in der Interphase zwischen Ficoll-Paque und Plasma sammeln und entsprechend mit dieser Zellschicht weiter verfahren wird. Wie bei der Isolation der Eosinophilen folgte eine negative immunomagnetische Separation über Biotin-markierte Primär- und magnetisch gelabelte Sekundärantikörper (198).

Monozyten machen 2-10 % der Leukozyten im Blut aus, daher wurde eine geringere Menge an Blut benötigt. So wurden einem gesunden Spender meist 15 ml entnommen und 1:4 mit PBS verdünnt. Für die Zentrifugation wurden spezielle 50 ml LeucoSEP-Röhrchen (Greiner Bio-One LeucoSEP Röhrchen aus Polypropylen, Thermo Fisher) verwendet. Diese enthalten eine poröse, biologisch inerte Polyethylen-Barriere in der Höhe von 15 ml, die das Schichten des Bluts auf das Ficoll-Paque und das anschließende Abnehmen der Interphase erleichtern und somit die Reinheit der Zellen erhöht.

In zwei dieser Röhrchen wurden je 15 ml Ficoll gefüllt und für 30 sek bei 1000 G zentrifugiert, damit das Ficoll-Paque die Barriere durchdringt und sich am Boden des Tubes absetzt. In jedes Röhrchen wurden nun 30 ml des verdünnten Vollbluts geschichtet und für 15 min bei 800 G zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte ohne Beschleunigung und Bremse, um die noch enthaltenen Thrombozyten nicht zu aktivieren. Nach der Zentrifugation wurden die obersten 20 ml Plasma verworfen und die Interphase, auch PBMC-Schicht (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) oder *buffy coat* genannt, entnommen. Diese enthielt neben den gesuchten Monozyten auch Dendritische Zellen, NK Zellen, Lymphozyten, basophile Granulozyten und Thrombozyten.

Als nächstes erfolgten drei Waschschrte mit Puffer zur Entfernung der Thrombozyten: bei 300 G für 10 min, 200 G für 15 min und 200 G für 10 min. Um die Zellen nicht zu aktivieren, wurde nach diesem Schritt nur noch mit kaltem Puffer gearbeitet, Inkubationsschritte erfolgten im Kühlschrank oder auf Eis, die Zentrifugationen bei 4°C. Das nach dem letzten Waschschrte entstandene Pellet wurde in 1 ml kaltem Puffer resuspendiert und die Zellzahl wie bei den Eosinophilen mit einer verbesserten Neubauer-Zählkammer bestimmt, um die Menge an zu verwendenden Reagenzien zu bestimmen. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt und nochmals bei 300 G für 10 min zentrifugiert.

Nun erfolgte das magnetische Labeling mit dem Pan Monocyte Isolation Kit, human (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach). Pro 10^7 Zellen wurde das Pellet in 40 µl Puffer resuspendiert und mit 10 µl *FcR Blocking Reagent* und 10 µl *Biotin-Antibody-Cocktail* für 5 min im Kühlschrank inkubiert. Der *Antibody-Cocktail* enthält Biotin-markierte monoklonale Antikörper gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glycophorin A, die entsprechend an alle Nicht-Monozyten binden. Im nächsten Schritt wurden 30 µl Puffer hinzugegeben. Alle Nicht-Monozyten wurden durch Hinzugabe von 20 µl *Anti-Biotin MicroBeads* magnetisch gelabelt. Nach 15 min Inkubation im Kühlschrank wurden die Zellen mit 2 ml Puffer gewaschen und bei 300 G zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und die Zellen in 500 µl Puffer resuspendiert.

Die magnetische Separation erfolgte analog zu der der eosinophilen Granulozyten: die indirekt mit *MicroBeads* gelabelten Nicht-Monozyten wurden in der magnetischen Säule zurückgehalten, während die Monozyten das

magnetische Feld durchlaufen. Der Efflux enthielt die aufgereinigte Monozyten-Fraktion.

9.5. Ausreifung isolierter Monozyten und Polarisierung zu M1/M2 Makrophagen

Um den möglichen Einfluss von einwandernden Eosinophilen auf die Polarisierung von Makrophagen in Folge eines Myokardinfarkts *in vitro* zu simulieren, wurden isolierte Monozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zu Makrophagen ausreifen gelassen (s. Abbildung 13). Wie eingangs beschrieben, polarisieren sich Makrophagen abhängig vom sie umgebenden Mikromilieu in Richtung inflammatorische M1- oder reparative M2-Makrophagen. Diese Einteilung ist jedoch stark vereinfacht, man sollte die Ausprägung des Phänotyps als Kontinuum vorstellen (78).

Für den Versuchsaufbau wurde sich an einer Studie orientiert, in der verschiedene Kulturbedingungen zur Polarisierung von Makrophagen erprobt wurde. Darin wurde festgestellt, dass eine phasische Inkubation, die ersten fünf Tage nur mit GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor) bzw. M-CSF (Monozytenkolonien-stimulierender Faktor) und dann weitere vier Tage mit polarisierenden Stimulantien die besten Ergebnisse erbrachte. (199)

So wurden die isolierten Monozyten mit einer Konzentration von 125.000 Zellen pro ml in RPMI 1640 Medium (RPMI 1640 Medium, gibco, Thermo Fisher) mit 10 % FBS und 1 % P/S resuspendiert. Davon wurden je 2 ml, also 250.000 Zellen pro Well auf einer 12-Well-Platte ausgesät.

Die koloniestimulierenden Faktoren GM-CSF und M-CSF dienen zur Ausreifung von Monozyten zu Makrophagen. Jedoch weisen beide bereits einen polarisierenden Effekt in die M1- oder M2-Richtung auf. GM-CSF stimuliert die Polarisierung in Richtung M1-Makrophagen, M-CSF hingegen in Richtung M2. Aus diesem Grund wurden die Ansätze aufgeteilt und für die ersten fünf Tage die eine Hälfte mit 20 ng/ml humanem GM-CSF (Recombinant Human GM-CSF, peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) und die andere Hälfte mit 20 ng/ml humanem M-CSF (Recombinant Human M-CSF, peprotech) inkubiert.

An Tag 5 wurde der Überstand abgesaugt und die Polarisierung mit den entsprechenden Stimulantien gestartet. Zur Generierung einer M1-Positivkontrolle

wurden einem der Wells je 20 ng/ml LPS, IL-6 (Recombinant Human IL-6, peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) und IFN- γ (Recombinant Human IL-6, peprotech) und GM-CSF hinzugefügt (M1-Positivkontrolle). Einem weiteren Well wie zuvor nur GM-CSF hinzugegeben (M0-Kontrolle). Durch den zuvor beschriebenen polarisierenden Effekt der Kolonie-stimulierenden Faktoren erwarten wie auch in diesem Well eine Polarisierung in Richtung M1-Phänotyp, jedoch weniger ausgeprägt als bei der M1-Positivkontrolle.

Als Positivkontrolle für den M2-Phänotyp wurde einem zuvor mit M-CSF inkubierten Well, an Tag 5 je 20 ng/ml IL-4 (Recombinant Human IL-4, peprotech), IL-13 (Recombinant Human IL-13, peprotech), IL-6 und M-CSF hinzugefügt. Ein weiteres Well wurde wie zuvor nur mit M-CSF behandelt (M0-Kontrolle). Hier ist eine Polarisierung in Richtung M2-Phänotyp zu erwarten.

Zur Untersuchung des Einflusses von eosinophilen Granulozyten auf die Polarisierung von Makrophagen wurden je zwei mit GM-CSF und zwei mit M-CSF vorbehandelte Wells mit dem Überstand aktivierter Eosinophiler inkubiert, denen zuvor 20 ng/ml GM-CSF bzw. M-CSF zugefügt wurde. Als Kontrolle, dass der Einfluss auf den Phänotyp nicht durch IL-5 induziert wurde, wurden je zwei

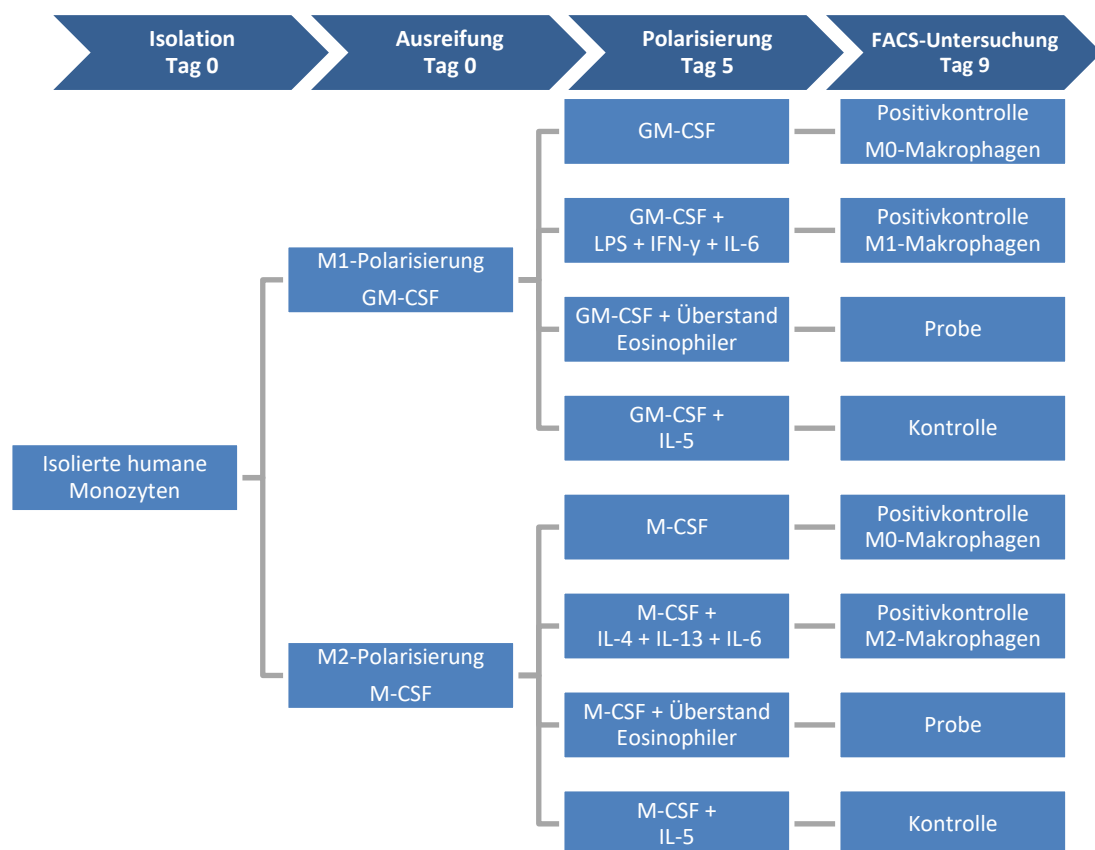


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Makrophagen-Polarisation

weitere Wells wie bei der Aktivierung der Eosinophilen mit 50 ng/ml IL-5 behandelt. Die Auswertung wurde durchflusszytometrisch an Tag 9 durchgeführt.

9.6. FACS-Analyse

Zur Beurteilung, ob der Überstand der aktivierten Eosinophilen einen Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen hat, wurde die Ausprägung verschiedener M1-Marker (CD80, CD86) und M2-Marker (CD163, CD206) durchflusszytometrisch an Tag 9 untersucht.

Dazu wurde der Überstand der Wells abgesaugt und zwei Mal mit PBS gewaschen. Zur enzymatischen Ablösung der Zellen wurde 1 ml Accutase (StemPro Accutase, gibco, Thermo Fisher) aufgetragen und für 15 min in den Inkubator verbracht. Die enzymatische Wirkung wurde durch das Einbringen von 2 ml RPMI mit 10 % FBS neutralisiert. Die nach wie vor adhärennten Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellkratzer (Cell Scraper 25 cm, SARSTEDT, Newton, NC, USA) abgekratzt.

Der Überstand wurde in ein 15 ml Falcon überführt und für 10 min bei 350 G zentrifugiert. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben zweimal mit je 2 ml FACS Puffer gewaschen. Währenddessen wurde der Antikörper-Mastermix erstellt, bestehend aus 88 µl FACS-Puffer und je 2 µl CD14, CD16, CD80, CD86, CD163 und CD206 pro Probe (s. Tabelle 2). Nach 20 min Inkubation im Kühlschrank wurden die Zellen erneut bei 350 G für 5 min zentrifugiert, in 200 µl FACS Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht.

Oberflächenantigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD14	HCD14	FITC	biolegend
CD16	V NK80	APC	biolegend
CD80	L 307.4	BV421	BD
CD86	BU63	PE	biolegend
CD163	GHI/61	PE-Cy7	biolegend
CD206	15-2	PerCP-Cy5.5	biolegend

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper

10. IL-5/ Eotaxin-1 ELISA

10.1. Prinzip

Zur Untersuchung, ob es nach einem Infarkt zu einem systemischen Anstieg von IL-5 und Eotaxin-1 kommt, wurde das Blut von Wildtyp-Tieren im *steady state*, an Tag 2 und Tag 6 post-Infarkt mit einem kommerziellen Sandwich-ELISA (Mouse IL-5 Quantikine ELISA Kit bzw. Eotaxin-1 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) untersucht. Das Prinzip des Sandwich-ELISA funktioniert ähnlich wie das des Zytokinarrays: eine Mikrotiterplatte ist mit monoklonalen Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen beschichtet. Die Probe wird auf die Platte gegeben und die Antikörper binden spezifisch an das Antigen. Dann wird ein zweiter monoklonaler Detektions-Antikörper darauf gegeben, der an das Antigen bindet. Dieser Antikörper ist Enzym-gekoppelt und wird mit Hilfe eines Substrats sichtbar gemacht. Die Farbumschlag entspricht der Menge an vorhandenem Antigen und wird als optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge photometrisch gemessen.

10.2. Durchführung

Zuerst wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und laut Herstellerangabe rekonstituiert. Zur Erstellung einer Standardreihe wurde der Standard in 1 ml Kalibrator-Puffer verdünnt und für 5 min auf einen Schüttler (Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach) gestellt. Mit dem Kalibrator-Puffer wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe erstellt, mit der in der Auswertung die Standardkurve erstellt und die Konzentration berechnet wurde. Die Stocklösung hatte eine Konzentration von 1000 pg/ml, als Negativkontrolle diente der Kalibrator-Puffer.

Nun wurden mit einer Multichannel-Pipette je 50 µl Verdünnungspuffer in jedes Well der 96-Well-Platte gegeben. Dazu wurden je 50 µl der Standards, der Kontrollen und der Serumproben gegeben. Im Falle des Eotaxin-1-ELISAs wurde die Serumproben zuvor 1:4 im Kalibrator-Puffer verdünnt. Durch vorsichtiges Tippen auf den Rand der Platte wurden die Proben gemischt. Die Platte wurde mit der dafür vorgesehenen Plastikfolie abgedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit banden die zu detektierenden Zielproteine an die mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Matrix.

Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit aspiriert und die Platte mithilfe einer Spritzflasche fünf Mal mit dem Waschpuffer gewaschen, um die ungebundenen Proteine abzuwaschen. Im nächsten Schritt wurden je 100 µl des Sekundärantikörper-Konjugats in jedes Well pipettiert und für weitere 2h inkubiert. Darauf folgten erneut fünf Waschschritte, um die ungebundenen Antikörper zu abzuwaschen. Danach wurden 100 µl Substratlösung hinzugegeben und für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Die Substratlösung reagierte nun mit dem Enzym-gekoppelten Konjugat, was zu einer Blaufärbung führte. Die optische Dichte korrelierte mit der Konzentration des Zielproteins. Um die Reaktion zu stoppen, wurden je 100 µl Stop-Lösung hinzugegeben, was zu einem sofortigen Farbumschlag von blau zu gelb führte.

Mithilfe eines Photometers (Tecan GENios Microplate Reader, Männedorf, Schweiz) wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Eine weitere Messung bei 540 nm diente zur Korrektur der Wellenlänge.

10.3. Auswertung

Mithilfe eines online-Auswerteprogramms (www.elisaanalysis.com) wurde mit den Werten der Standardreihe eine Logistische Regression mit 4 Parametern erstellt und mit der daraus gewonnenen Formel die Konzentrationen der Proben berechnet. Alle Proben wurden in Triplets pipettiert, aus denen der Mittelwert berechnet wurde.

11. Statistische Auswertung

Der Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf den Herzinfarkt und seine Heilung wurden bisher noch nicht erforscht. Daher handelt es sich bei der vorliegenden Doktorarbeit um eine explorative Studie.

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme GraphPad Prism (Version 5.1, San Diego, CA, USA) und IBM SPSS Statistics (Version 25, Armonk, NY, USA) verwendet. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism erstellt.

In dieser Doktorarbeit wurde der Einfluss von Eosinophilen auf den Herzinfarkt anhand einer Eosinophilen-defizienten Knockout-Gruppe und einer Kontrollgruppe untersucht. Zur statistischen Auswertung des vorliegenden Versuchsaufbaus wurden einfaktorielle univariate Testverfahren angewandt. Der

Faktor ist das Vorhandensein von Eosinophilen, die Variablen die einzelnen Messparameter.

Zum Vergleich der Mittelwerte unter den Gruppen wurden Tests für unabhängige Stichproben angewandt (s. Abbildung 14). Für Vergleiche innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Messzeitpunkten wurden abhängige Testverfahren verwendet. Zu allererst wurden die Gruppen mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. In Gruppen, deren Stichprobenanzahl zu klein war, wurde die Normalverteilung graphisch geprüft. Der t-test für unabhängige Stichproben setzt neben der Normalverteilung eine Varianzhomogenität voraus. Dazu wurde der F-/Levene-Test vorgeschaltet. Im Falle gleicher Varianzen wurde ein ungepaarter t-test durchgeführt, im Falle ungleicher Varianzen wurde eine Welch-Korrektur vorgenommen. Ergab der Shapiro-Wilk-Test bei unabhängigen Stichproben keine Normalverteilung, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Bei normalverteilten abhängigen Stichproben wurde ein gepaarter t-test, bei nicht-normalverteilten abhängigen Stichproben der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Zum Vergleich von mehreren Gruppen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one way ANOVA*) durchgeführt. Zuvor wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und dem Levene-Test auf Varianzhomogenität geprüft. Zur Neutralisierung der α -Fehler-Kumulation wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die Gruppen wurden anschließend untereinander mit dem Bonferroni-Mehrfach-Testung verglichen. Im Falle einer nicht parametrischen Verteilung oder ungleicher Varianzen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet, bei dem geprüft wird, ob sich die zentralen Tendenzen mehrerer unabhängiger Stichproben unterscheiden.

Ergebnisse gelten ab einem $p < 0,05$ als statistisch signifikant. Der p-Wert gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit eines statistischen Tests an, also die Wahrscheinlichkeit, dass die Arbeitshypothese irrtümlich angenommen wurde, obwohl die Nullhypothese stimmt. Der Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit wird ganz wesentlich vom Stichprobenumfang beeinflusst und lässt damit alleine keinen Rückschluss auf die Stärke des Einflusses eines Faktors auf die abhängige Variable zu. Daher wurde zusätzlich die Effektstärke, auch Effektgröße, berechnet. Diese ist unabhängig von der Stichprobenanzahl und sollte daher

besonders in explorativen Studien errechnet werden. *Cohen's d* berechnet sich aus der mittleren Differenz zweier Gruppen geteilt durch die gepoolte Standardabweichung. Werte zwischen 0,2 und 0,5 zeigen einen kleinen, zwischen 0,5 und 0,8 einen mittleren und $>0,8$ einen großen Effekt (200).

Die Mittelwerte in den Graphen wurden solange nicht anders beschrieben als arrhythmisches Mittel mit dem Standard Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

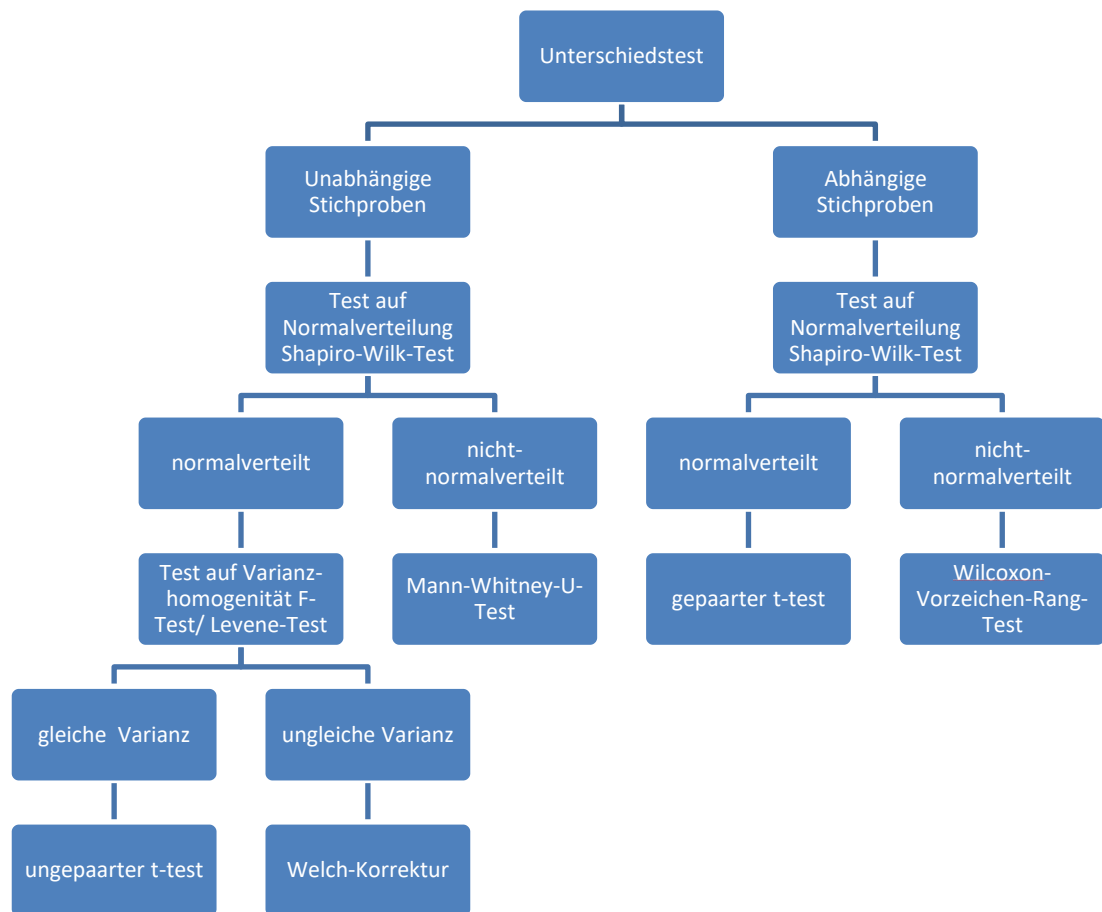


Abbildung 14: Übersicht angewandter statistischer Tests

V. ERGEBNISSE

1. Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und Gewebepersistenz nach Myokardinfarkt

Zur Untersuchung, ob und über welchen Zeitraum eosinophile Granulozyten im murinen Infarktmodell das Myokard infiltrieren, wurde bei C57BL/6J-Mäusen eine transiente LAD-Ligatur durchgeführt. 2, 6 und 30 Tage nach dem Ischämie-Reperfusionsschaden wurden die Tiere getötet, die Herzen immunhistologisch gefärbt und auf die Infiltration durch eosinophile Granulozyten untersucht.

Die immunhistologischen Analysen zeigten, dass eosinophile Granulozyten in großer Zahl das Infarktgebiet infiltrieren. Im Periinfarktbereich sowie im restlichen nicht-geschädigten Herzgewebe waren kaum Eosinophile zu finden (s. Abbildung 15B)

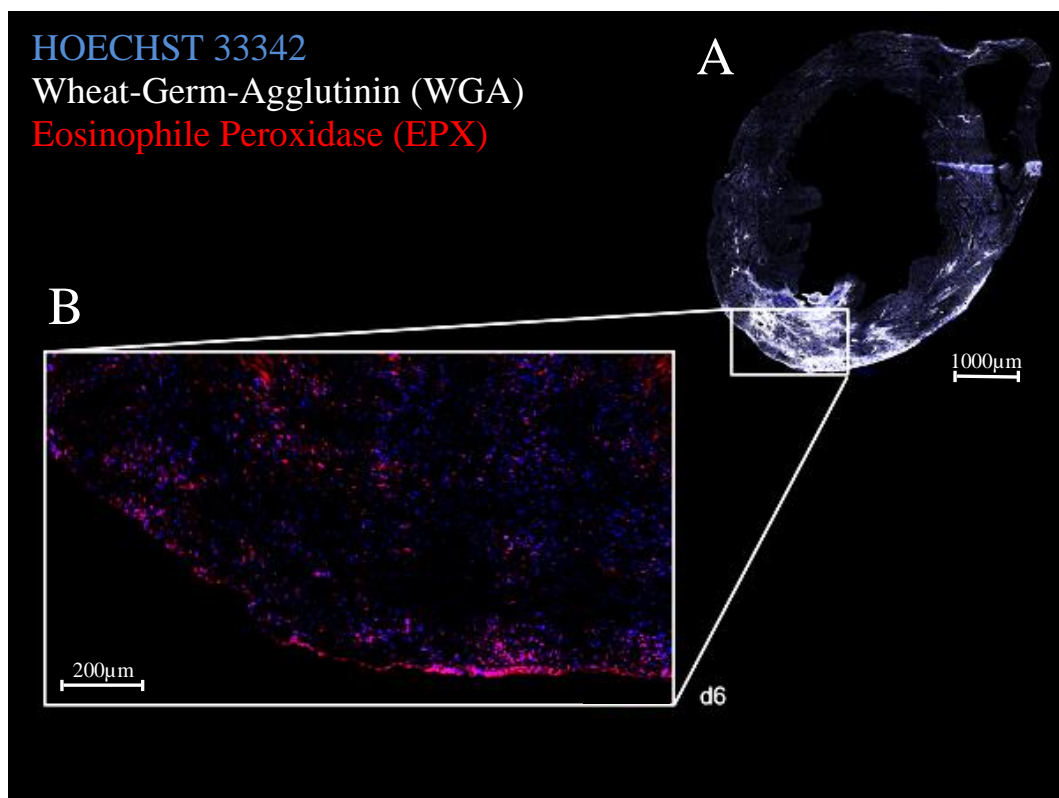


Abbildung 15: Epifluoreszenzaufnahme eines Horizontalschnitts eines Herzes Tag 6 nach Infarkt (A) mit Vergrößerung des Infarktgebietes (B)

A: transmuraler Infarkt im anterolateralen Bereich mit beginnender Fibrose des Infarktgebietes; Mosaikaufnahme in 200x-Vergrößerung, blau: Zellkernfärbung mit HOECHST 33342, weiß: Fibrose mit WGA AlexaFluor 647

B: deutliche Infiltration des Infarktgebietes mit Entzündungszellen, darunter auch Eosinophile; Mosaikaufnahme in 400x-Vergrößerung (318 x 238µm), blau: Zellkernfärbung mit HOECHST 33342, rot: eosinophile Peroxidase (EPX), AlexaFluor 594

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich wies die Infiltration der Eosinophilen wie bei anderen Entzündungszellen einen dynamischen Verlauf auf: während im gesunden Herzgewebe keine Eosinophilen residieren, zeigten die histologischen Untersuchungen an Tag 2 nach Infarkt eine deutliche Infiltration im Infarktgebiet. Bis zum Messzeitpunkt an Tag 6, am Übergang von der inflammatorischen zur proliferativen Phase, nahm die Zahl der Eosinophilen im Infarktgebiet weiter zu. Bis Tag 30 nahm ihre Zahl wieder ab. In der zellarmen Infarktnarbe waren immer noch vereinzelte Eosinophilen zu detektieren. Der Bonferroni-Mehrfachvergleich (s. Abbildung 17) nach der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab für den Unterschied vom gesunden Herz zu den verschiedenen Messzeitpunkten nur an Tag 6 ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,002$). Beim Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte untereinander war nur der Unterschied zwischen Tag 6 und Tag 30 statistisch signifikant ($p = 0,010$). In weiterführenden Untersuchungen mit höherem Stichprobenumfang gilt es zu bestätigen, dass die Mittelwertvergleiche der anderen Messzeitpunkte auch signifikant werden würden.

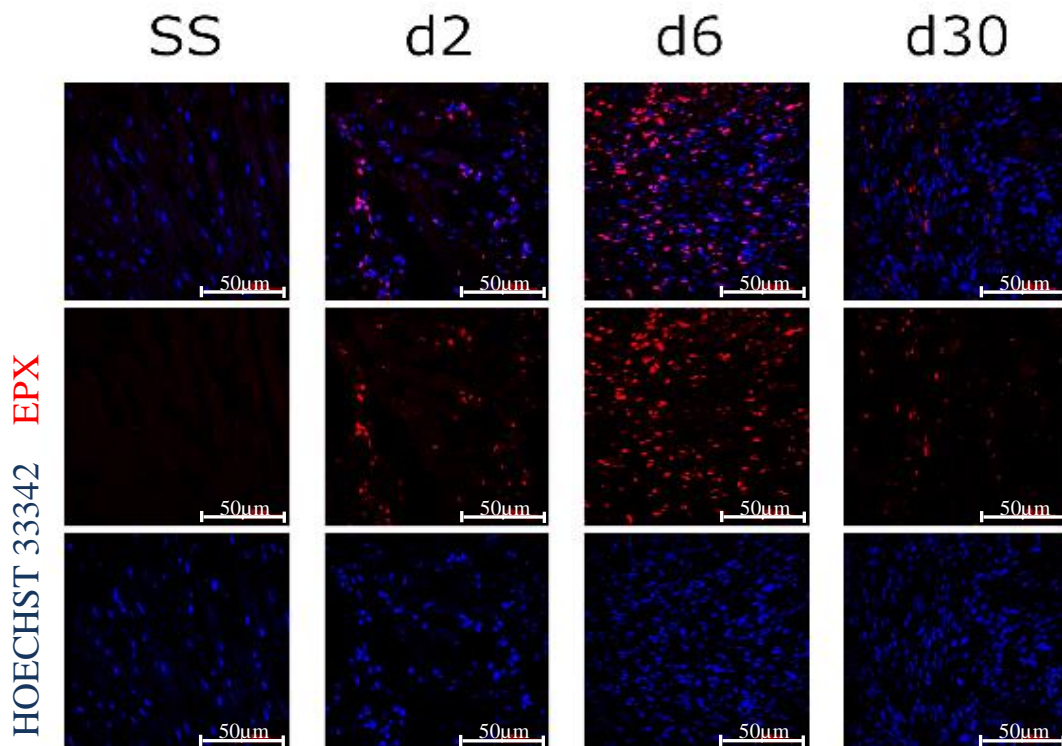


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Zellinfiltration im Infarktgebiet

Im *steady state* sind gesunde Kardiomyozyten mit zentralen Zellkernen zu sehen. An Tag 2 nach Infarkt ist die regelmäßige Anordnung der Herzmuskelzellen zerstört, Nekrose dominiert das Bild. Entzündungszellen infiltrieren das Infarktgebiet. Bis Tag 6 nimmt die Zelldichte weiter zu, der Zelldebris wird nach und nach abgeräumt. An Tag 30 ist die Infarktheilung größtenteils abgeschlossen, es verbleibt eine bindegewebige, zellarme Narbe.

Zur besseren Visualisierung wurden die Kanäle einzeln (unten und Mitte) und zusammengeführt (oben) dargestellt; 400x-Vergrößerung ($318 \times 238\mu\text{m}$), blau: Zellkernfärbung mit HOECHST 33342, rot: eosinophile Peroxidase (EPX), AlexaFluor 594

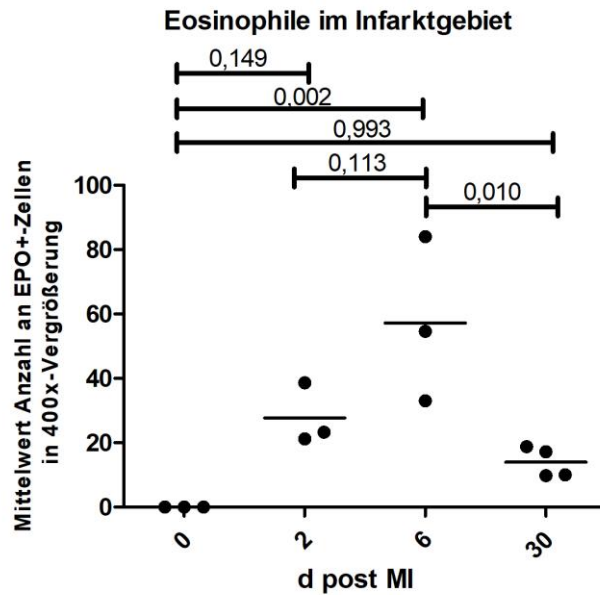


Abbildung 17: Immunhistologische Quantifizierung der einwandernden Eosinophilen im *steady state*, an Tag 2, 6 und 30 nach Infarktinduktion in C57BL/6-Mäusen

Im *steady state* waren keine Eosinophilen im Herzen zu finden. Nach Infarktinduktion stieg die Zahl der Eosinophilen an Tag 2 auf im Mittel 27,6 Eosinophile an und gipfelte an Tag 6 mit 57,2 Eosinophilen pro Bild. An Tag 30 wurden im Narbengewebe noch vereinzelt Eosinophile detektiert.

Mittelwert der Eosinophilen aus 6 400x-Vergrößerung (318 x 238µm) pro Maus (n=3-4)
einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur, adjustierte p-Werte

Mit der histologischen Untersuchung konnte somit gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten das Infarktgebiet infiltrieren. Ob und welchen Einfluss sie auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling haben, sollten *in vivo* Untersuchungen an Eosinophilen-defizienten Δ dblGATA1-Mäusen klären.

2. Schädigender Effekt eosinophiler Granulozyten im Rahmen des linksventrikulären Remodelings

Zur Untersuchung, ob die zuvor bestätigte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten einen Einfluss auf die Infarktheilung hat, wurden Positron-Emissions-Tomographie-Studien an Eosinophilen-defizienten Mäusen und einer Kontrollgruppe an Tag 6 und Tag 30 nach LAD-Ligatur durchgeführt.

2.1. Totales Perfusionsdefizit/ Infarktgröße

Das totale Perfusionsdefizit (TPD) beschreibt den prozentualen Anteil an minderperfundiertem Gewebe am gesamten Myokard. Das nekrotische Infarktgewebe verstoffwechselt weniger Radiotracer als das vitale Myokard. Die Metabolisierung des Radiotracers ^{18}F FDG ermöglicht daher präzise Rückschlüsse auf die myokardiale Vitalität und damit die Infarktgröße. Bei der PET-

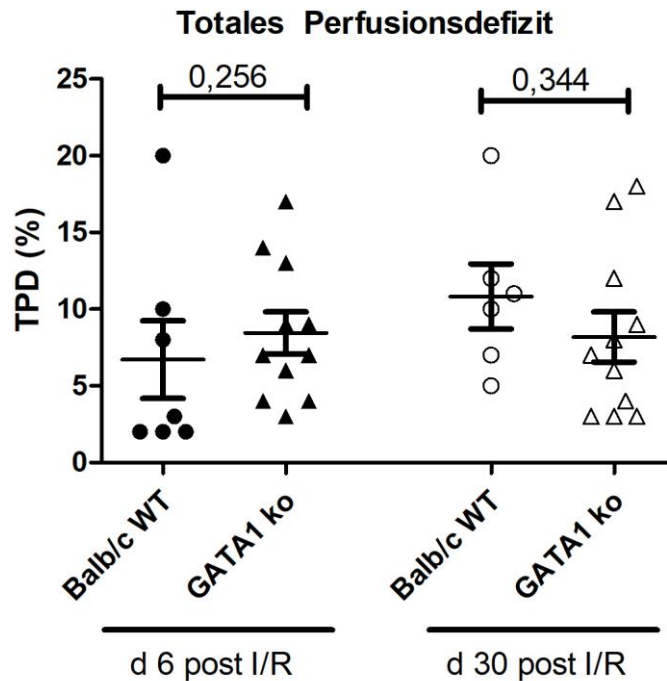


Abbildung 18: Totales Perfusionsdefizit Tag 6 und Tag 30 nach Ischämie-Reperfusionsschaden

Darstellung des prozentualen Anteils des minderperfundierten Myokards in % zwischen der Eosinophilen-defizienten Knockout-Gruppe und der Balb/c Kontroll-Gruppe. $n = 7-11$
d6: Mann-Whitney-U-Test, d30: t-test für unabhängige Stichprobe, Mittelwerte \pm SEM

Untersuchung des totalen Perfusionsdefizits war weder an Tag 6 (Cohen's $d = 0,33$, $p = 0,256$) noch an Tag 30 (Cohen's $d = 0,34$, $p = 0,344$) ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Gruppe zu erkennen (s. Abbildung 18). Insgesamt ist damit der Effekt der eosinophilen Granulozyten auf die Infarktgröße zu vernachlässigen.

2.2. Linksventrikuläre Funktionsparameter

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) und das enddiastolische Volumen (LVEDV) sind wichtige Parameter zur Evaluation der Herzfunktion. Die LVEF gibt Auskunft über die Auswurfleistung des linken Ventrikels und damit die systolische Funktion. Je höher die LVEF ist, desto besser ist die Kontraktilität in der Systole.

Die Messung der linksventrikulären Ejektionsfraktion ergab an Tag 6 eine um 12,6 % und an Tag 30 eine um 20,6 % relativ bessere Auswurfleistung in den Eosinophilen-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (s. Abbildung 19). Der genetische Knockout der eosinophilen Granulozyten hat mit einem Cohen's d von 0,93 an Tag 6 und 1,38 an Tag 30 einen starken Effekt

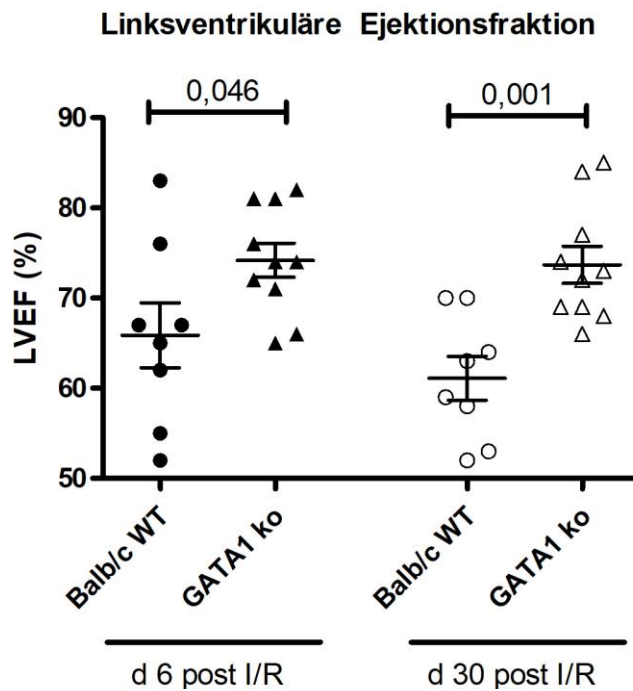


Abbildung 19: LVEF Tag 6 und Tag 30 nach Ischämie-Reperfusionsschaden

Die Gata1 Knockout-Mäuse zeigten an Tag 6 mit 74,2 % eine signifikant bessere mittlere Ejektionsfraktion als die Wildtyp-Mäuse mit 65,9 %. Daraus ergab sich eine Differenz der Mittelwerte von 8,3 %. Dieser Effekt akzentuierte sich bis Tag 30 auf eine mittlere Differenz von 12,6 %. Die Pumpfunktion der Δ dblGATA-1-Gruppe blieb über die Zeit annähernd gleich, während sich die der Kontrollgruppe um 4,75 % verschlechterte. Bemerkenswert ist neben dem Mittelwertsunterschied auch der Streuungsunterschied: die relative Streuung ist an Tag 6 in der Wildtyp-Gruppe (Variationskoeffizient $v = 15,5$) fast doppelt so hoch wie in der Knockout-Gruppe ($v = 8,1$). Der Unterschied der Variationskoeffizienten ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,142$).

t-test für unabhängige Stichproben, Mittelwert \pm SEM, $n = 8-10$

auf die LVEF. Beide Effekte sind mit einem p von 0,046 an Tag 6 und einem p von 0,001 an Tag 30 statistisch signifikant. Damit zeigten die Wildtyp-Mäuse mit Eosinophilen zu beiden Messzeitpunkten eine signifikant schlechtere Pumpfunktion im Vergleich zu den Eosinophilen-defizienten Δ dblGATA-1-Mäusen. Diese Ausprägung akzentuierte sich zusätzlich im Verlauf der Infarktheilung bis zu Tag 30.

Ähnliche Ergebnisse ergab die Messung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens. Das LVEDV ist ein Parameter für die linksventrikuläre Dilatation und das maladaptive kardiale Remodeling infolge eines Infarktes. Je größer das enddiastolische Volumen ist, desto größer ist die Kammerdilatation und die Maladaptation.

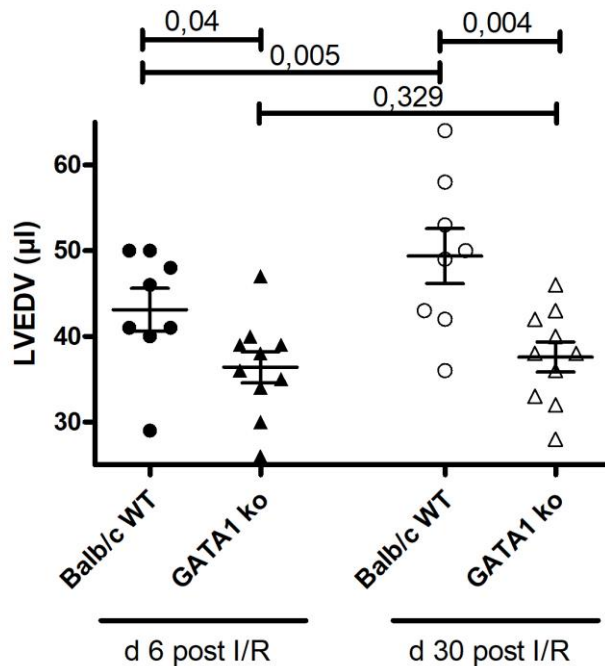
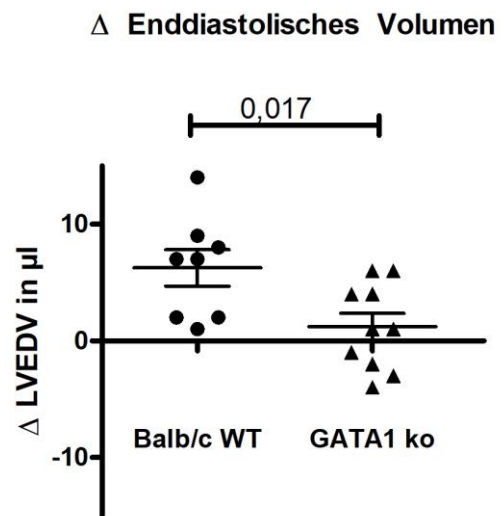
A Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen**B**

Abbildung 20: LVEDV Tag 6 und Tag 30 nach Ischämie-Reperfusionsschaden sowie (A) und Δ LVEDV (B)

zwischen den Gruppen: t-test für unabhängige Stichproben, Mittelwert \pm SEM, $n = 8-10$

innerhalb der Gruppen: t-test für abhängige Stichproben, $n = 8-10$

Δ LVEDV = LVEDV d30 - LVEDV d6

Auch hier zeigten die Wildtyp-Tiere an Tag 6 mit 43,13 μ l ein größeres LVEDV als die Knockout-Tiere mit 36,4 μ l (s. Abbildung 20A). Daraus ergab sich eine Mittelwertdifferenz von 6,7 μ l. Die relative Mittelwertdifferenz betrug 15,6 %. An Tag 30 nach Ischämie-Reperfusionsschaden verstärkte sich die Ausprägung ähnlich wie beim LVEF. So betrug das LVEDV bei den Kontrolltieren an Tag 30 im Mittel 49,4 μ l, das der Knockout-Tiere im Gegensatz dazu nur 37,6 μ l. Damit zeigten die Kontrolltiere an Tag 30 ein um 11,8 μ l bzw. 23, 9% größeres LVEDV als die Knockout-Tiere. Zu beiden Messzeitpunkten zeigte die genetische Defizienz der Eosinophilen einen starken Effekt auf die linksventrikuläre Dilatation (Cohen's d Tag 6 = 0,96, Tag 30 = 1,27). Beide Effekte sind statistisch signifikant (Tag 6 $p = 0,040$, Tag 30 $p = 0,004$).

Der direkte Vergleich der Messwerte innerhalb der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf zeigte eine signifikante Verschlechterung des enddiastolischen Volumens. So kam es mit 43,1 μ l an Tag 6 und 49,4 μ l an Tag 30 zu einer mittleren Zunahme von 6,3 μ l in den linksventrikulären Dimensionen. Aus diesen Daten lässt sich ein starker Effekt (Cohen's $d = 0,74$) der eosinophilen Granulozyten auf die linksventrikuläre Dilatation ableiten ($p = 0,005$). Im Gegensatz dazu kam es in der Eosinophilen-defizienten Gruppe nur zu einer marginalen Zunahme des LVEDV

von 1,2 μ l. Die Darstellung des Δ der Messwerte von Tag 30 und Tag 6 in Abbildung 20B verdeutlicht diesen Effekt erneut (Cohen's $d = 1,1$, $p = 0,017$). Insgesamt zeigten die Eosinophilen-defizienten Knockout-Mäuse somit eine signifikant bessere Pumpleistung und eine verringerte linksventrikuläre Dilatation.

2.3. Metabolisches Volumen

Das metabolische Volumen bemisst das Volumen im Myokard mit dem höchsten Stoffwechselumsatz. Infolge eines Infarktes kommt es zu einer kompensatorischen Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten. Dadurch vergrößert sich das metabolische aktive Areal im Myokard, wodurch das messbare metabolische Volumen ansteigt. So werden Rückschlüsse auf die kardiale Hypertrophie ermöglicht. Ebenso korreliert das LVMV mit der interstitiellen Fibrose im nicht-infarzierten Herzgewebe. Daher ist das LVMV ein experimenteller Messparameter zur Untersuchung des maladaptiven kardialen Remodelings.

An Tag 6 war noch kein Unterschied zwischen den Eosinophilen-defizienten und den Wildtyp-Mäusen zu erkennen (s. Abbildung 21). Die genetische Eosinophilen-Defizienz zeigte keinen Effekt auf das LVMV an Tag 6 (Cohen's $d = 0,18$, $p = 0,69$). Dieses Ergebnis entsprach der Erwartungshaltung, da die kompensatorische Hypertrophie sich erst im späteren Verlauf des kardialen Remodelings ausprägt. Im Gegensatz dazu zeigten die PET-Untersuchungen an Tag 30 ein um 14,7 % höheres LVMV in der Wildtyp-Gruppe im Vergleich zur Knockout-Gruppe. Der Effekt der Eosinophilen auf die kardiale Hypertrophie ist an Tag 30 als stark (Cohen's $d = 0,88$) zu werten und statistisch signifikant ($p = 0,04$).

Auffällig ist auch der Streuungsunterschied der beiden Gruppen an Tag 6 und Tag 30: Die Wildtyp-Gruppe zeigte sehr homogene Messwerte (Variationskoeffizient v Tag 6 = 10,4 %, v Tag 30 = 9,6%), während die Knockout-Gruppe eine große Streuung aufwies (v Tag 6 = 23,5 %, v Tag 30 = 21,6 %). Die hohe Individualität deutet darauf hin, dass es sich auch um individuelle Effekte handeln könnte und nicht unbedingt um systematische Effekte, die mit der Depletion der eosinophilen Granulozyten assoziiert sind. Ein größerer Stichprobenumfang könnte Aufschluss darüber geben.

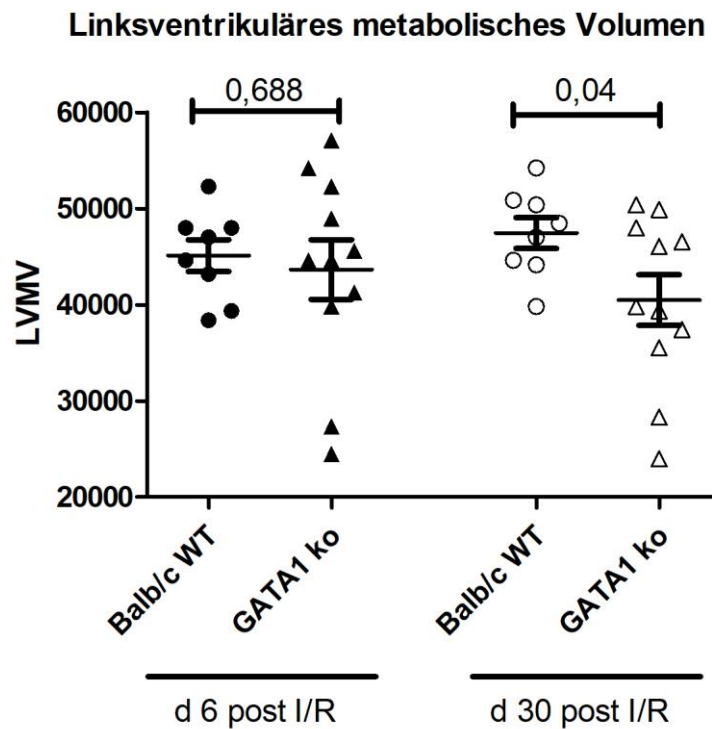


Abbildung 21: LVMV an Tag 6 und Tag 30 nach Ischämie-Reperfusionsschaden

t-test für unabhängige Stichproben mit Welch-Korrektur, Mittelwerte \pm SEM, n = 8-11

In der Gesamtheit zeigen die PET-Studien einen signifikanten Effekt der genetischen Defizienz der Eosinophilen auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling im Mausmodell. Zusammenfassend scheinen die Eosinophilen zwar keinen Einfluss auf die Infarktgröße selbst zu nehmen, dafür aber auf die linksventrikulären Funktionsparameter und die kardiale Hypertrophie. Die Unterschiede zwischen Knockout- und Kontrollgruppe waren meist bereits an Tag 6 sichtbar und signifikant, haben sich aber im Laufe der Infarktheilung bis zur Messung an Tag 30 noch weiter verstärkt.

2.4. Histologische Quantifizierung der Fibrosefläche

Nach der PET-Messung an Tag 30 wurden die Herzen entnommen und immunhistologisch untersucht, um mögliche Ursachen für das veränderte kardiale Remodeling durch die eosinophilen Granulozyten zu finden. Dazu wurden die Herzen in horizontaler Ebene in drei Ebenen geschnitten. Ebene 1 ist die Herzbasis, Ebene 2 der mittlere Teil und Ebene 3 der apikale Teil. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden die Untersuchungen in Ebene 3 durchgeführt, da dort der Infarkt lokalisiert ist. Es wurden die prozentuale Fibrosefläche, die Anzahl an Makrophagen und die Kapillardichte im Periinfarktgebiet quantifiziert.

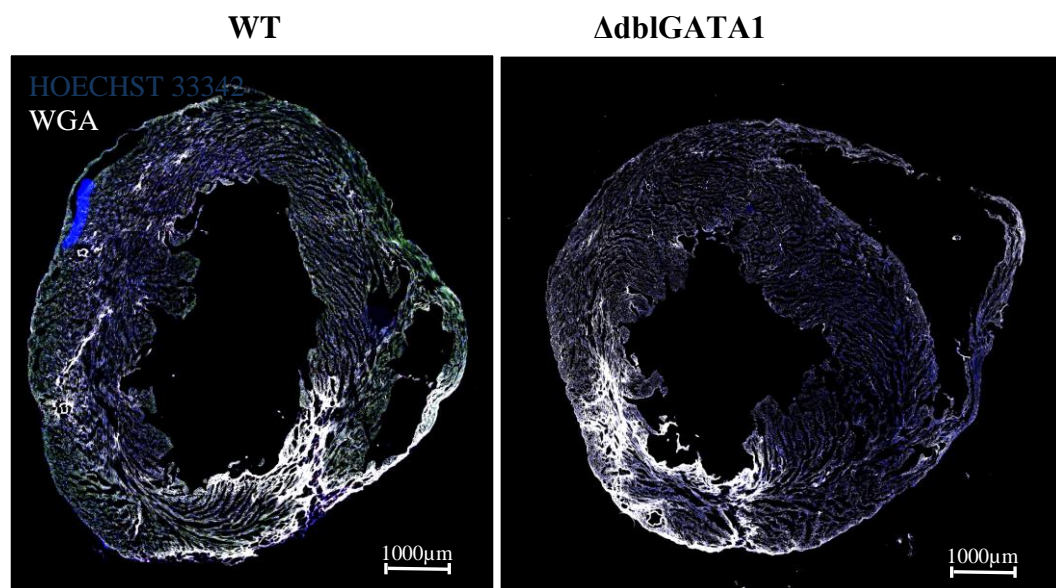


Abbildung 22: Repräsentative horizontale Übersichtsaufnahmen eines WT- Herzens (links) und eines Δ dblGATA1-Herzens (rechts) Tag 30 post Infarkt

In den Epifluoreszenzaufnahmen ist die bindegewebige Infarktnarbe (weiß) deutlich zu sehen. Ebenso kann man die Ausdünnung der Ventrikelwand um die Infarktregion herum erkennen.

Mosaik-Aufnahme aus 200x-Vergrößerungen, blau: Zellkernfärbung mit HOECHST 33342, weiß: Fibrosefläche mit WGA AlexaFluor647

Die Quantifizierung der relativen Fibrosefläche ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren (s. Abbildung 23). So zeigten die Wildtyp-Tiere eine um 1,75 % größere prozentuale Fibrosefläche in der Auswertung von Ebene 3 (Cohen's $d = 1,16$, $p = 0,04$) und eine um 1,22 % größere Fibrose in Ebene 2 und 3 (Cohen's $d = 1,11$, $p = 0,048$). Damit scheinen die eosinophilen Granulozyten einen profibrotischen Effekt im Rahmen des kardialen Remodelings zu haben. Umgekehrt scheint ihre Depletion die Fibrosierung einzudämmen. Diese Auswertung korreliert mit den Ergebnissen des

metabolischen Volumens aus den PET-Studien. Dort zeigten die Wildtyp-Mäuse an Tag 30 ein größeres metabolisches Volumen, was für eine vermehrte Fibrose spricht. Dies bestätigt sich nun histologisch. Auffällig ist auch, dass die Wildtyp-Gruppe eine hohe Individualität aufwies, während die Werte der Knockout-Gruppe sehr homogen waren.

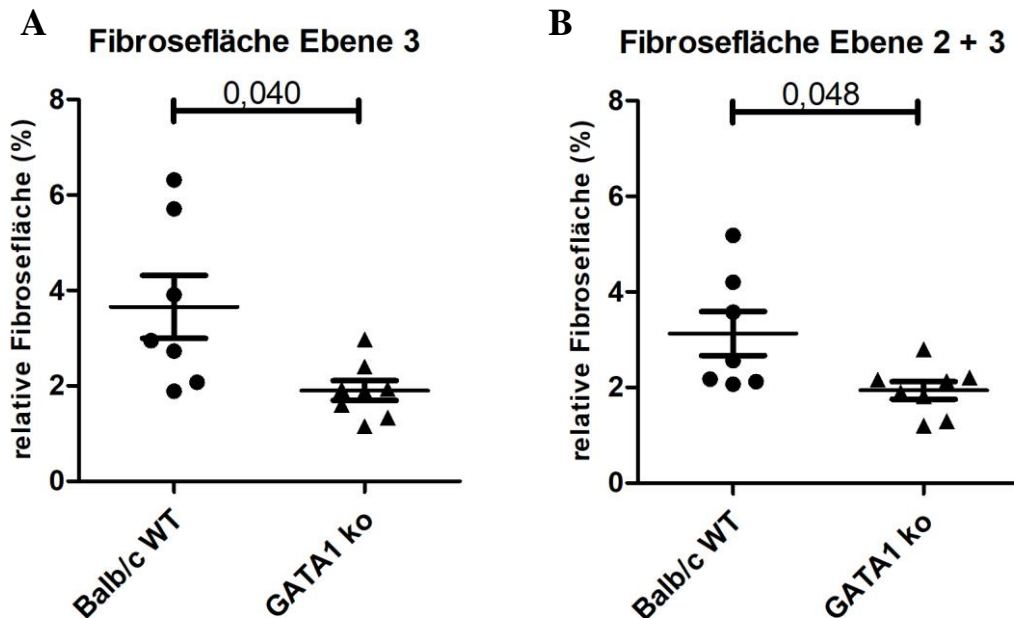


Abbildung 23: prozentuale Fibrosefläche in Ebene 3 (A) und Ebene 2+3 (B)

Zur Quantifizierung der Fibrosefläche wurde der Mittelwert der WGA-positiven Fläche aus jeweils vier Schnittebenen aus Ebene 2 und 3 berechnet (IV.5.2). Links sieht man die Auswertung nur aus Ebene 3, rechts die Mittelwerte aus Ebene 2 und 3. Die prozentuale Fibrosefläche ist der Quotient aus absoluter Fibrosefläche geteilt durch die gesamte Herzfläche.

t-test für unabhängige Stichproben mit Welch-Korrektur, Mittelwerte \pm SEM, $n = 7-8$

2.5. Anzahl an CD68-positiven Zellen

Ein möglicher Erklärungsversuch für die phänotypischen Unterschiede in der Infarktheilung stellt die Interaktion eosinophiler Granulozyten mit der Rekrutierung und Polarisierung von Monozyten und Makrophagen dar, die wiederum abhängig von ihrem Phänotyp die Infarktheilung positiv oder negativ beeinflussen. Daher wurden als nächstes die CD68-positiven Makrophagen im Infarkt- und im Perinfarktgebiet quantifiziert (s. Abbildung 24).

Die quantitative Auswertung der Makrophagen im Infarktgebiet zeigte in den Wildtyp-Mäusen mit im Mittel 35,1 Makrophagen pro 400x-Vergrößerung ($318 \times 238 \mu\text{m}$) um 40 % mehr Makrophagen als in den Knockout-Mäusen mit 21,1 CD68⁺-positiven Zellen (s. Abbildung 25A). Dieser Effekt ist zwar stark

(Cohen's $d = 0,91$), betrachtet man jedoch die Verteilung der Werte in Abbildung 25 fällt auf, dass die Stärke des Effekts auf ein einziges Wildtyp-Tier mit einer eklatant höheren Zahl an Makrophagen zurückzuführen ist. Die Werte der anderen Tiere liegen in derselben Größenordnung wie die Knockout-Tiere. Der beobachtete Effekt ist nicht signifikant und aus diesen Gründen zu vernachlässigen ($p = 0,073$).

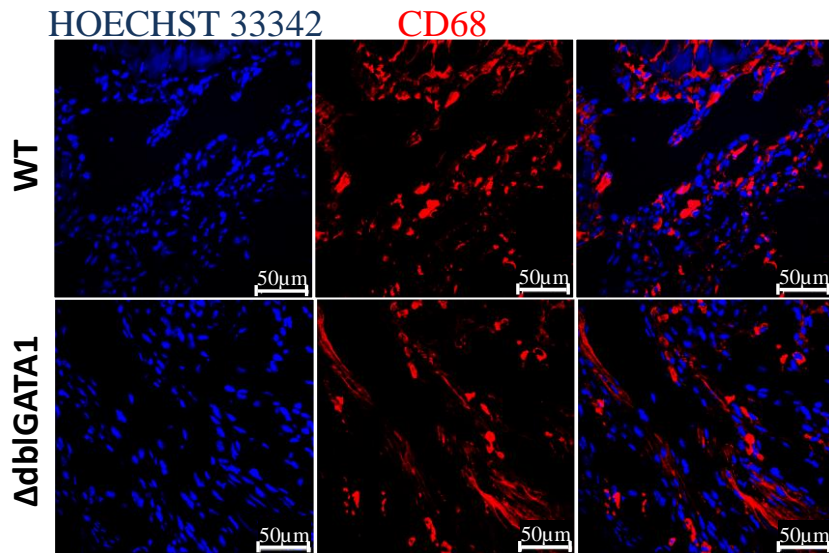


Abbildung 24: Repräsentative Aufnahmen aus dem Infarktgebiet Tag 30 einer Balb/c WT-Maus und einer $\Delta b1GATA1$ -Knockout-Maus

An Tag 30 besteht die Infarktnarbe aus einem dichten Kollagenetzwerk. Der Großteil der vorhandenen Zellen ist CD68-positiv. Zu diesem Zeitpunkt ist davon auszugehen, dass es sich um Makrophagen handelt.

Zur besseren Darstellung wurden die Kanäle einzeln und zusammengeführt dargestellt; 400x-Vergrößerung ($318 \times 238\mu\text{m}$), blau: Zellkernfärbung mit HOECHST 33342, rot: CD68, AlexaFluor 594

Der Periinfarktbereich, die sogenannte *border zone*, wird in geringerem Maße von Entzündungszellen infiltriert. Die Quantifizierung der CD68-positiven Zellen in der *border zone* ließ einen signifikanten Unterschied erkennen (s. Abbildung 25B). Mit im Mittel 9,9 CD68-positiven Makrophagen pro Sichtfeld wiesen die Wildtyp-Tiere mehr als doppelt so viele Makrophagen auf als die Eosinophilen-defizienten Knockout-Tiere. Der Effekt der genetischen Depletion der Eosinophilen ist stark (Cohen's $d = 1,20$) und statistisch signifikant ($p = 0,029$). Aus diesen Beobachtungen lässt sich ein direkter oder indirekter Einfluss von Eosinophilen auf die Makrophagen-Rekrutierung in den Periinfarktbereich ableiten, der die Infarktheilung beeinflussen könnte.

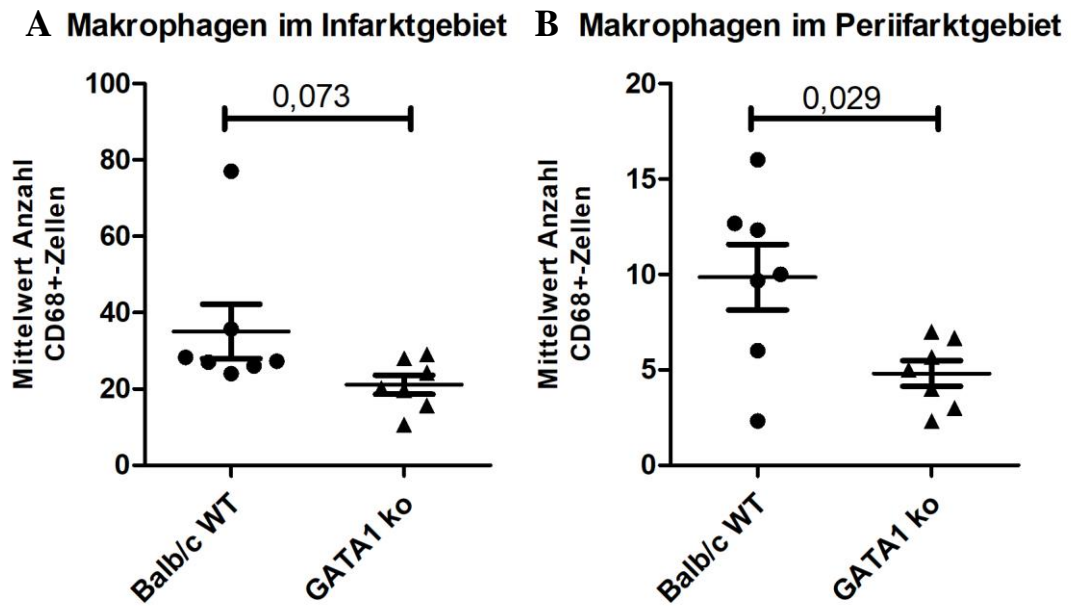


Abbildung 25: Quantitative Analyse der CD68⁺-Zellen im Infarkt und Periinfarktgebiet d30

In beiden Regionen weist die Wildtyp-Gruppe (Infarkt = 53,8 %, border zone = 46,0 %) eine sehr viel größere relative Streuung auf als die Knockout-Gruppe (Infarktgebiet = 31,3 %, border zone = 37,1 %)

Makrophagen Infarktgebiet: Mann-Whitney-U-Test; border zone: t-test für unabhängige Stichproben, Mittelwerte \pm SEM, n = 7

2.6. Kapillardichte im Periinfarktgebiet

Die Neoangiogenese nach einem Myokardinfarkt ist ein wichtiger Bestandteil der Infarktheilung. Ob Eosinophile im Infarktgeschehen einen Einfluss auf die Gefäßdichte im Periinfarktgebiet haben, sollte eine immunhistologische Quantifizierung mit einem CD31-Antikörper klären. CD31 wird in Gefäßendothelzellen exprimiert und eignet sich daher gut dazu, die Gefäßdichte innerhalb eines Gewebes zu quantifizieren (s. Abbildung 26).

Die semiautomatische Quantifizierung der Gefäßdichte im Periinfarktgebiet ergab eine signifikant höhere Kapillardichte in den Eosinophilen-defizienten Knockout-Tieren im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (s. Abbildung 27). Die Knockout-Tiere zeigten eine um 67,2 % größere Fläche an Kapillaren als die Wildtyp-Tiere. Daher scheint die genetische Eosinophilen-Defizienz einen starken Effekt auf die Kapillardichte im Periinfarktgebiet zu haben (Cohen's d 1,44, $p = 0,005$).

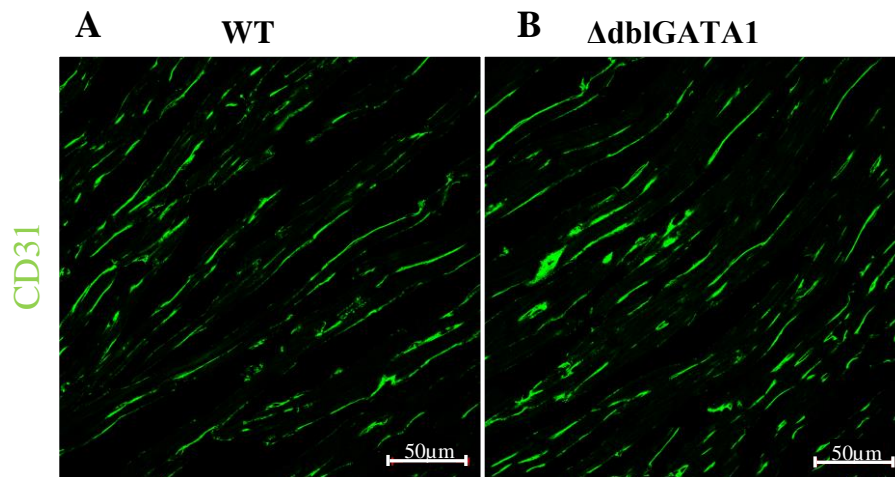


Abbildung 26: Repräsentative Aufnahmen des Periinfarktbereichs an Tag 30 zur Darstellung der Kapillardichte, Wildtyp (A), Knockout (B)

Zu sehen sind die regelmäßig angeordneten Kardiomyozyten im Periinfarktbereich mit den sie umgebenden Kapillaren in grün. Bei genauerer Betrachtung lässt sich beim Knockout-Tier eine höhere Dichte an CD31-positiven Signal erkennen.

400x-Vergrößerung (318 x 238 μ m), grün: CD31 mit AlexaFluor488

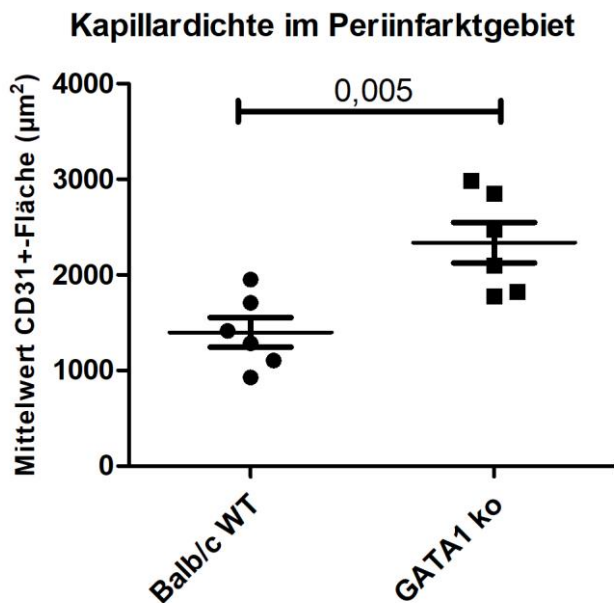


Abbildung 27: Quantifizierung der Gefäßdichte im Periinfarktgebiet

Die Δ dblGATA1-Mäuse zeigen mit einer mittleren Fläche von 2337 μ m² pro 400x-Vergrößerung (318 x 238 μ m) eine um 67,2% höhere Gefäßdichte als die Balb/c-Mäuse. Die Signaldichte wurde automatisch mit dem Auswerteprogramm AxioVision quantifiziert.

t-test für unabhängige Stichproben, Mittelwerte \pm SEM, n = 6

Zusammenfassend ergaben die histologischen Untersuchungen im Wildtyp eine signifikant größere Fibrosefläche, eine höhere Anzahl an Makrophagen im Periinfarktbereich und eine geringere Gefäßdichte im Periinfarktbereich im Vergleich zu den Eosinophilen-defizienten Δ dblGATA-1-Mäusen.

	Balb/c WT		Gata1 ko				
Parameter	Mittelwert	Variationskoeffizient (%)	Mittelwert	Variationskoeffizient (%)	relative Mittelwert-differenz	Cohen's <i>d</i>	p-Wert
TPD d6 (%)	6,71	99,81	8,46	53,52	+25,9%	0,33	0,256
TPD d30 (%)	10,83	47,95	8,18	66,23	-24,5%	0,50	0,344
EF d6 (%)	65,88	15,45	74,20	8,08	+12,6%	0,93	0,046
EF d30 (%)	61,13	11,28	73,70	8,86	+20,6%	1,38	0,001
EDV d6 (µl)	43,13	16,27	36,40	15,82	-15,6%	0,96	0,040
EDV d30 (µl)	49,38	18,37	37,60	14,63	-23,9%	1,27	0,004
ΔEDV (µl)	6,25	70,40	1,20	306,33	-80,8%	1,08	0,017
MV d6 (mm³)	45.102	10,41	43.66	23,52	-3,2%	0,18	0,688
MV d30 (mm³)	47.441	9,57	40.47	21,63	-14,7%	0,88	0,04
Fibrose Ebene 3 (%)	3,66	47,82	1,90	30,60	-47,9%	1,16	0,04
Fibrose Ebene 2+3 (%)	3,13	38,99	1,94	26,65	-38,0%	1,11	0,048
Makrophagen Infarktzone	35,05	53,81	21,10	31,28	-39,8%	0,91	0,073
Makrophagen border zone	9,86	46,00	4,81	37,11	-51,2%	1,20	0,029
Gefäßdichte border zone (µm²)	1398	27,16	2337	22,16	67,2%	1,44	0,005

Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse aus PET und Histologie

Vergleich der Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Balb/c Wildtyp- und der ΔdblGATA1-Gruppe. Angegeben ist zudem die relative Mittelwertdifferenz in %, die Effektstärke in Cohen's *d* und der berechnete p-Wert. Starke Effekte und signifikante p-Werte sind zur besseren Veranschaulichung grün hinterlegt.

TPD = Totales Perfusionsdefizit, EF = Ejektionsfraktion, EDV = Enddiastolisches Volumen, MV = Metabolisches Volumen

2.7. Zytokinarray

Auf der Suche nach Mechanismen der Einflussnahme von Eosinophilen auf das Infarktgeschehen und die Infarktheilung wurde als nächstes die Zytokinexpression im infarzierten Myokard sechs Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden mithilfe eines Zytokinarrays verglichen. Ein solcher Zytokinarray ermöglicht die gleichzeitige Analyse von 111 Zytokinen in einem Zelllysats und gibt so einen breitgefächerten Überblick über das Proteom.

Die Analyse ergab für folgende Zytokine einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Gruppe:

Zytokin	Mittelwert Balb/c WT	Mittelwert Gata1 ko	relative Mittelwert- differenz	Cohen's <i>d</i>	p-Wert
Amphiregulin	36822	14866	-59,6%	1,31	0,027
Chemerin	48418	23600	-51,2%	1,22	0,043
CXCL11	31568	11755	-62,7%	1,29	0,03
IL-11	36435	13048	-64,2%	1,28	0,049
IL-33	71282	53963	-24,3%	1,24	0,039

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Zytokine mit einem signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Gruppe

Darstellung der mittleren Signalintensität, relativen Mittelwertdifferenz, Effektstärke und p-Wert

3. Beeinflussung der Immunzellrekrutierung durch eosinophile Granulozyten

3.1. FACS-Ergebnisse

Zur Untersuchung, ob die Defizienz der Eosinophilen einen Einfluss auf die Infiltration ins infarzierte Herz und die Zellkomposition im Blut hat, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Im Blut wurde die Anzahl von Eosinophilen, Neutrophilen und Monozyten im *steady state*, an Tag 2 und an Tag 6 untersucht. Im Herzen wurden die Anzahl von Eosinophilen, Neutrophilen, Makrophagen im *steady state* und an Tag 2 untersucht. Die Makrophagen wurden anhand ihrer Ly6C-Expression weiter differenziert.

3.1.1. Eosinophile

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Eosinophilen im Blut zeigt deutlich, dass der genetische Knockout erfolgreich war. Weder im *steady state*, noch an Tag 2 und Tag 6 waren in den Knockout-Tieren periphere Eosinophile zu finden (s. Abbildung 28). Im Gegensatz dazu machten die Eosinophilen in den Wildtyp-Tieren im *steady state* im Mittel 0,78% der CD45-positiven Zellen aus.

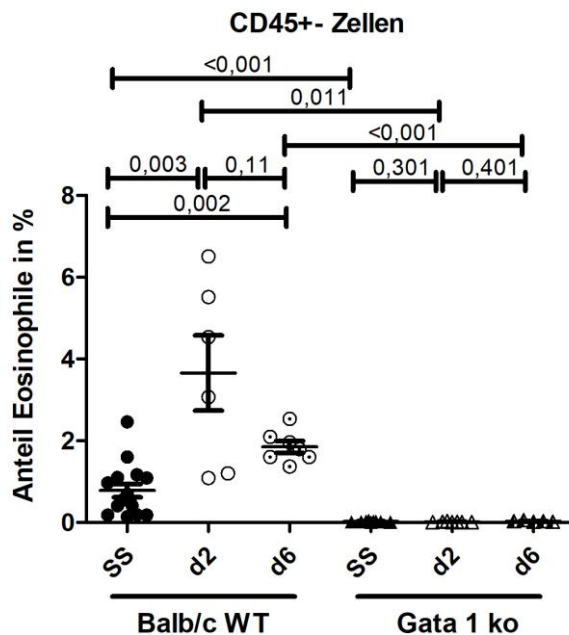


Abbildung 28: Eosinophile im Blut im *steady state*, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion

Darstellung des prozentualen Anteils der eosinophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten (CD45-positive Zellen) im Blut im *steady state*, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion
t-test für unabhängige Stichproben bzw. Mann-Whitney-U-Test, Mittelwerte \pm SEM

Nach Infarktinduktion kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Eosinophilen auf 3,66 % an Tag 2 (Cohen's $d = 4,49$, $p = 0,003$) und 1,85 % an Tag 6 (Cohen's $d = 0,53$, $p = 0,002$). Von Tag 2 zu Tag 6 ist im Mittel ein Absinken des Eosinophilenanteils zu beobachten. Dieser Mittelwertsunterschied (Cohen's $d = 1,03$) ist durch die Inhomogenität der Tag 2 Gruppe und die geringe Gruppengröße jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,11$). Insgesamt wird deutlich, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden zu einem systemischen Anstieg der eosinophilen Granulozyten im murinen Organismus führt.

Die FACS-Untersuchungen im Herzen zeigten ein ähnliches Bild. In den Knockout-Tiere waren weder im *steady state* noch an Tag 2 Eosinophile vorzufinden (s. Abbildung 29). Dies bestätigte die Effektivität des genetischen Knockouts erneut. Erwartungsgemäß zeigten auch die Wildtyp-Tiere im *steady*

state kaum residente Eosinophile im Herzen. Die Messungen an Tag 2 zeigten jedoch eine Infarkt-bedingte Infiltration von eosinophilen Granulozyten ins Herz. So waren in der Herzbasis, dem sogenannten *remote areal*, im Mittel 29,9 Eosinophile pro mg Herzgewebe nachzuweisen. Dies ist ein Anstieg um 4462% (Cohen's $d = 1,88$, $p = <0,001$). In der Herzspitze, die das Infarktgebiet beinhaltet, waren 60,3 Eosinophile pro mg Herzgewebe zu finden. Hier betrug der Anstieg zwischen *steady state* und Tag 2 sogar 7327%. (Cohen's $d = 1,84$, $p = <0,001$).

Es ist auch zu erkennen, dass in die Herzspitze mit dem Infarktgebiet im Mittel etwa doppelt so viele Eosinophile einwanderten wie in die nicht-infarzierte Herzbasis (Cohen's $d = 1,5$, $p = 0,003$).

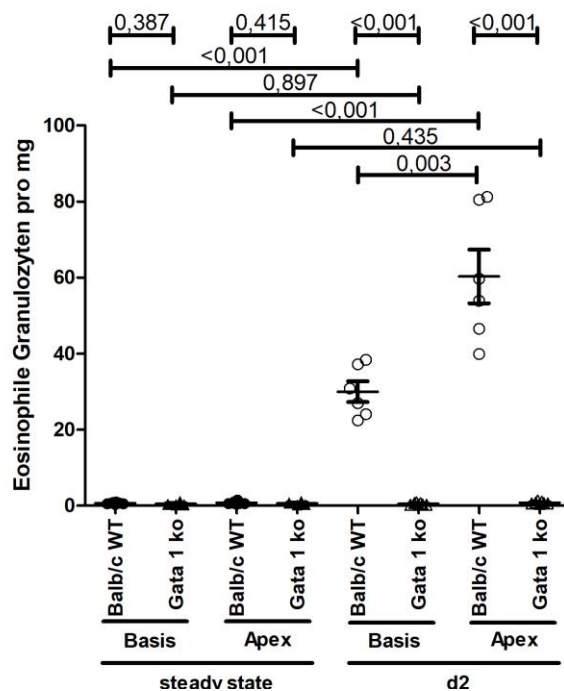


Abbildung 29: Eosinophile im Herzen im *steady state* und Tag 2 nach Infarktinduktion

Darstellung der eosinophilen Granulozyten im Herzen pro mg Herzgewebe
t-test für unabhängige Stichproben bzw. Mann-Whitney-U-Test, Mittelwerte \pm SEM

Die durchflusszytometrische Untersuchungen der eosinophilen Granulozyten bestätigten die Ergebnisse aus der Histologie. So konnte nachgewiesen werden, dass eosinophile Granulozyten das Herzgewebe infolge einer Ischämie-Reperfusion infiltrieren - und zwar sowohl das Infarktgebiet als auch das nicht-infarzierte Gewebe. Im Folgenden wurde untersucht, ob der genetische Knockout der Eosinophilen einen Einfluss auf anderen Immunzellpopulationen hat.

3.1.2. Neutrophile Granulozyten

Die Untersuchung der neutrophilen Granulozyten im Blut zeigte in beiden Gruppen einen dynamischen Verlauf (s. Abbildung 30). So kommt es sowohl in der Wildtyp- als auch in der Knockout-Gruppe zu einem systemischen Anstieg an Tag 2 nach Infarktinduktion. An Tag 6 sinkt der Anteil der Neutrophilen wieder auf ein physiologisches Niveau. In der Wildtyp-Gruppe stieg der Anteil der Neutrophilen von 14,7 % im *steady state* auf 21,2 % an Tag 2 an (Cohen's $d = 0,95$, $p = 0,04$) und ging auf 17,1 % an Tag 6 zurück (Cohen's $d = 0,69$, $p = 0,229$). Die Knockout-Gruppe zeigte einen Anstieg von 11,7 % im *steady state* auf 27,3 % an Tag 2 (Cohen's $d = 1,18$, $p = 0,002$) und einen Abfall an Tag 6 auf 10,4 % (Cohen's $d = 1,12$, $p = 0,003$).

Der Vergleich der Gruppen untereinander lässt im *steady state* (Cohen's $d = 0,49$, $p = 0,164$) und an Tag 2 (Cohen's $d = 0,49$, $p = 0,617$) jeweils einen schwachen Effekt durch die genetische Defizienz der Eosinophilen auf die peripheren Neutrophilen erkennen. Diese Effekte sind jedoch statistisch nicht signifikant und ob ihrer geringen Stärke zu vernachlässigen. An Tag 6 zeigten die Wildtyp-Tiere mit 17,1 % deutlich mehr Neutrophile als die Knockout-Tiere mit 10,4 % (Cohen's $d = 1,16$, $p = 0,04$). Dies könnte für eine Persistenz der

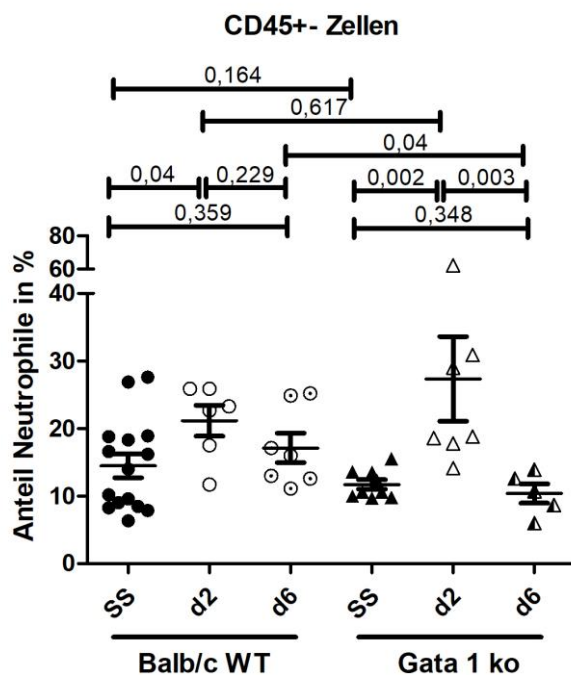


Abbildung 30: Neutrophile im Blut im *steady state*, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion

Darstellung des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten (CD45-positive Zellen) im Blut im *steady state*, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion
t-test für unabhängige Stichproben bzw. Mann-Whitney-U-Test, Mittelwerte \pm SEM

Entzündungsreaktion im Herzen sprechen, die einen systemischen Einfluss haben könnte.

Die Untersuchung der Neutrophilen im Herzen zeigt in beiden Gruppen eine deutliche Infiltration infolge des Infarktes (s. Abbildung 31). In der Auswertung fallen drei Beobachtungen auf:

Erstens: im *steady state* waren keine neutrophilen Granulozyten im Herzen zu finden. Die detektierten Zellen stammen vermutlich aus dem Blut und sind auf eine unzureichende Perfusion mit PBS bei der Entnahme zurückzuführen.

Durch den Infarkt kam es in beiden Gruppen zu einer massiven Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Apex und Basis. Der Effekt der Infarktinduktion auf die Neutrophilenzahl ist in allen Fällen stark und statistisch signifikant (WT Basis Cohen's $d = 1,45$, $p = 0,021$; WT Apex Cohen's $d = 1,74$, $p = 0,006$; KO Basis Cohen's $d = 1,29$, $p = 0,002$; KO Apex Cohen's $d = 1,35$, $p = 0,022$).

Zweitens: die Infiltration in den Apex mit dem Infarktgebiet war deutlich höher als in die Basis. So kam es in den Wildtyp-Tieren in der Herzbasis zu einem Anstieg um 1520%, im Apex um 7860 %. In den Knockout-Tieren war in der Basis ein Anstieg von 5837% zu beobachten und im Apex von 11.196 %.

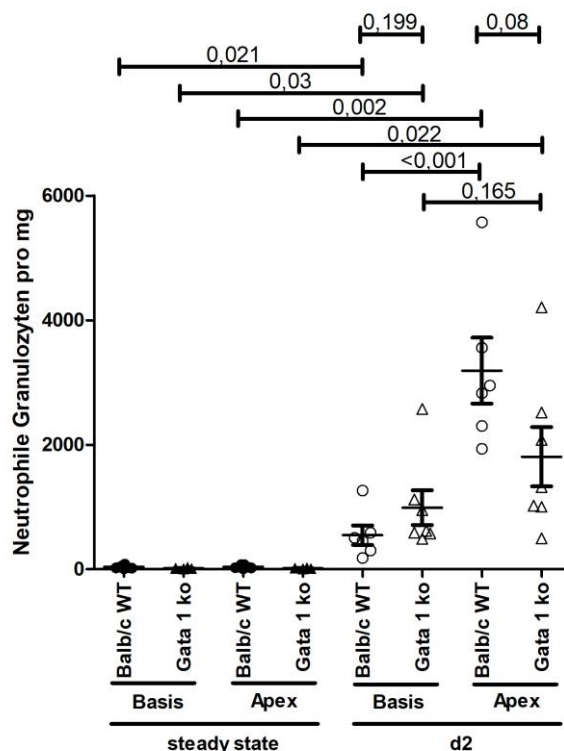


Abbildung 31: Neutrophile im Herzen im *steady state* und Tag 2 nach Infarktinduktion

Darstellung der neutrophilen Granulozyten im Herzen pro mg Herzgewebe
t-test für unabhängige Stichproben bzw. Mann-Whitney-U-Test, Mittelwerte \pm SEM

Drittens: nach Infarktinduktion an Tag 2 zeigten die Wildtyp-Tiere im Apex 76,6 % mehr neutrophile Granulozyten pro mg als die Knockout-Gruppe. Der Effekt ist stark (Cohen's $d = 0,98$), jedoch durch die geringe Gruppengröße nicht statistisch signifikant ($p = 0,08$). Aus dieser Beobachtung ließe sich ein chemotaktischer Effekt der Eosinophilen ins Infarktgebiet ableiten.

3.1.3. Monozyten im Blut/ Makrophagen im Herzen

Infolge des Infarktes kam es in beiden Gruppen zu einem Anstieg der Monozyten im Blut an Tag 2 und an Tag 6 nach Infarktinduktion (s. Abbildung 32). In der Wildtyp-Gruppe kam es vom *steady state* zu Tag 2 zu einem Anstieg von 2,1 % auf 4,4 % der CD45-positiven Zellen (Cohen's $d = 1,23$, $p = 0,022$) und in der Knockout-Gruppe von 1,2 % auf 3,6 % (Cohen's $d = 1,02$, $p = 0,005$). In beiden Gruppen nahm die Monozyten-Zahl bis Tag 6 wieder ab, war jedoch im Vergleich zum *steady state* noch leicht erhöht.

Insgesamt sollte bei dieser Beurteilung die nicht-parametrische Verteilung der Messwerte, besonders an Tag 2, berücksichtigt werden und die Beobachtungen mit einem größeren Stichprobenumfang verifiziert werden. Auffällig ist auch, dass die Wildtyp-Mäuse im *steady state* bereits mehr periphere Monozyten aufwiesen als die Knockout-Mäuse (Cohen's $d = 0,7$, $p = 0,009$). An Tag 2

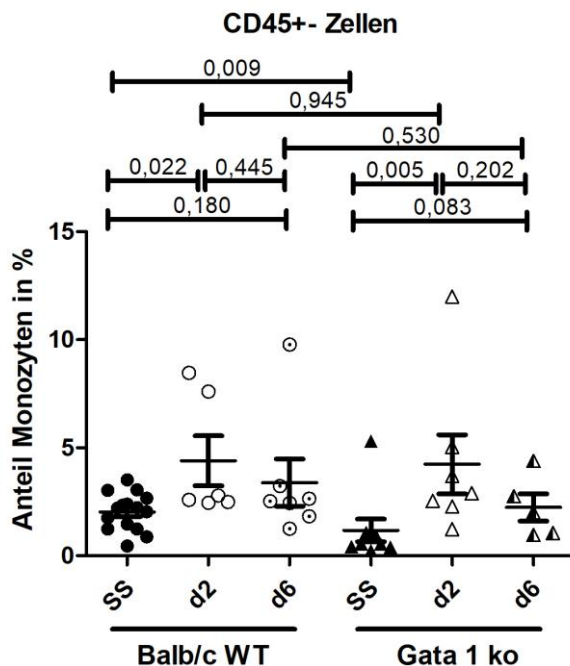


Abbildung 32: Monozyten im Blut im *steady state*, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion

Darstellung des prozentualen Anteils der Monozyten an den Gesamtleukozyten (CD45-positive Zellen) im Blut im *steady state*, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion
t-test für unabhängige Stichproben bzw. Mann-Whitney-U-Test, Mittelwerte \pm SEM

(Cohen's $d = 0,05$, $p = 0,945$) und Tag 6 (Cohen's $d = 0,48$, $p = 0,53$) ist kein statistisch signifikanter Unterschied zu erkennen.

Bei den Makrophagen im Herzen war in beiden Gruppen eine residente Population von rund 200 Makrophagen pro mg Herzgewebe darzustellen (s. Abbildung 33). Nach Infarktinduktion kam es bei beiden Gruppen in Basis und Apex zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Makrophagen (WT Basis Cohen's $d = 1,19$, $p = 0,021$; WT Apex Cohen's $d = 1,74$, $p = 0,003$; KO Basis Cohen's $d = 1,52$, $p = 0,002$; KO Apex Cohen's $d = 1,19$, $p = 0,05$).

Die Infiltration war erwartungsgemäß im Apex mit dem Infarktgebiet stärker als in der Herzbasis (WT Cohen's $d = 1,6$, $p = 0,005$, KO Cohen's $d = 0,69$, $p = 0,226$). Die Wildtyp-Tiere mit Eosinophilen zeigten im Apex statistisch signifikant mehr Makrophagen als die Knockout-Tiere (Cohen's $d = 1,18$, $p = 0,21$), in der Basis war kein statistisch signifikanter Unterschied zu erkennen (Cohen's $d = 0,25$, $p = 0,145$). Diese Beobachtungen deckten sich mit denen der neutrophilen Granulozyten im Apex an Tag 2. Gemeinsam könnte dies auf einen chemotaktischen Reiz, bedingt durch die Eosinophilen, hindeuten. Ebenso deckten sich diese Beobachtung mit der histologischen Quantifizierung der

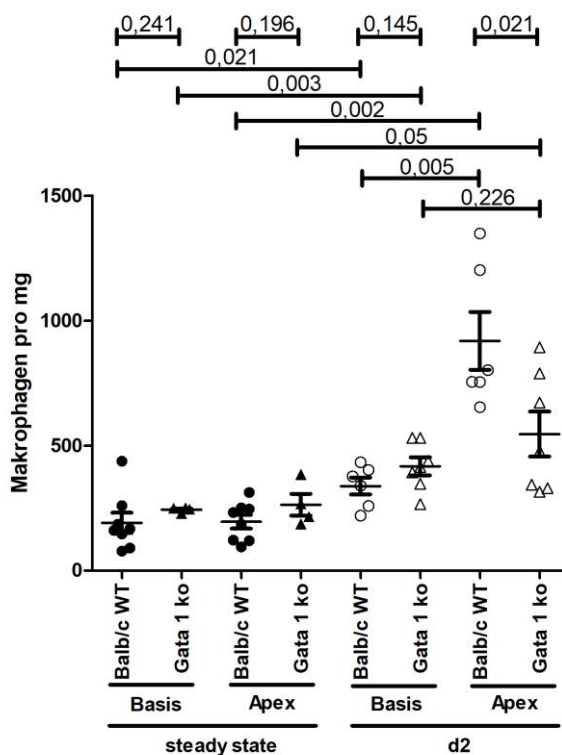


Abbildung 33: Makrophagen im Herzen im *steady state* und an Tag 2 nach Infarktinduktion

Darstellung der eosinophilen Granulozyten im Herzen pro mg Herzgewebe
t-test für unabhängige Stichproben bzw. Mann-Whitney-U-Test, Mittelwerte \pm SEM

Makrophagen an Tag 30, bei der die Wildtyp-Gruppe auch mehr Makrophagen aufwies als die Knockout-Gruppe.

Die kardialen Makrophagen wurden an Tag 2 auf ihre Ly6C-Expression untersucht (s. Abbildung 34). Ly6C wird auf proinflammatorischen Monozyten und M₁-Makrophagen exprimiert. Weder in der Basis noch im Apex war ein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Gruppe zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die Eosinophilen keinen Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen infolge eines Myokardinfarkts haben.

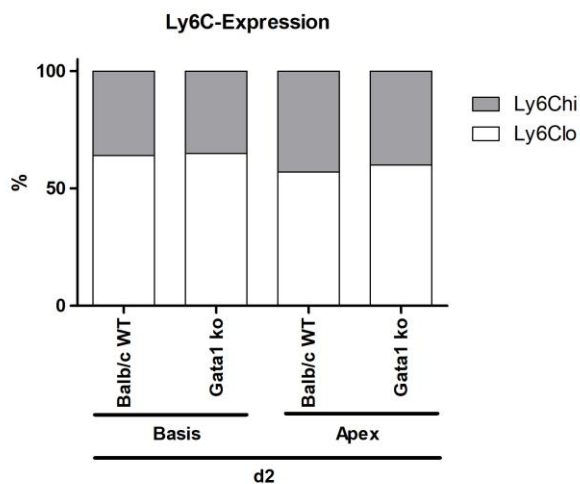


Abbildung 34: Ly6C-Expression Tag 2 nach Infarktinduktion

Prozentuale Verteilung der Ly6C^{hi}- und Ly6C^{lo}-Populationen, n = 7-8

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass es infolge eines Myokardinfarkts zu einem systemischen Anstieg von Eosinophilen, Neutrophilen und Monozyten im Blut kommt. Ebenso ist die Infiltration dieser Zellen ins infarzierte Herz zu beobachten. Erwartungsgemäß konnte gezeigt werden, dass in den Apex mit dem Infarktgebiet mehr Entzündungszellen einwandern als in die nicht-infarzierte Herzbasis.

Beim Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp-Gruppe ist zu erkennen, dass in der Wildtyp-Gruppe an Tag 2 mehr neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den Apex einwandern als in der Knockout-Gruppe. Daraus könnte man einen chemotaktischen Effekt, direkt oder indirekt bedingt durch die Eosinophilen, ableiten.

3.2. *In vitro* Experimente

Zur Bestätigung der erhobenen FACS-Daten wurden Koinkubationsversuche mit Makrophagen und dem Überstand aktivierter Eosinophiler durchgeführt.

3.2.1. Einfluss von Eosinophilen auf die Polarisierung von Makrophagen

Zur Untersuchung des Einflusses von Eosinophilen auf die Polarisierung von Makrophagen wurden humane Monozyten isoliert und nach 5-tägiger Inkubation mit GM-CSF bzw. M-CSF zusätzlich mit dem Überstand aktivierter Eosinophiler inkubiert. Als Positivkontrolle für die M1-Population dienten Ansätze, die mit GM-CSF und ab Tag 5 zusätzlich mit LPS, IFN- γ und IL-6 inkubiert wurden. Die Positivkontrolle für die M2-Population wurde mit M-CSF und ab Tag 5 zusätzlich mit IL-4, IL-13 und IL-6 ausreifen gelassen. Kontrollansätze wurden mit IL-5 durchgeführt, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf das IL-5 zurückzuführen sind, mit dem die Eosinophilen aktiviert worden waren.

An Tag 9 wurden die Zellen auf die Expression der M1-Marker CD80 und CD86 sowie der M2-Marker CD163 und CD206 untersucht. Die FACS-Analyse ergab keinen Unterschied in der Expression der M1-Marker CD80 und CD86 zwischen

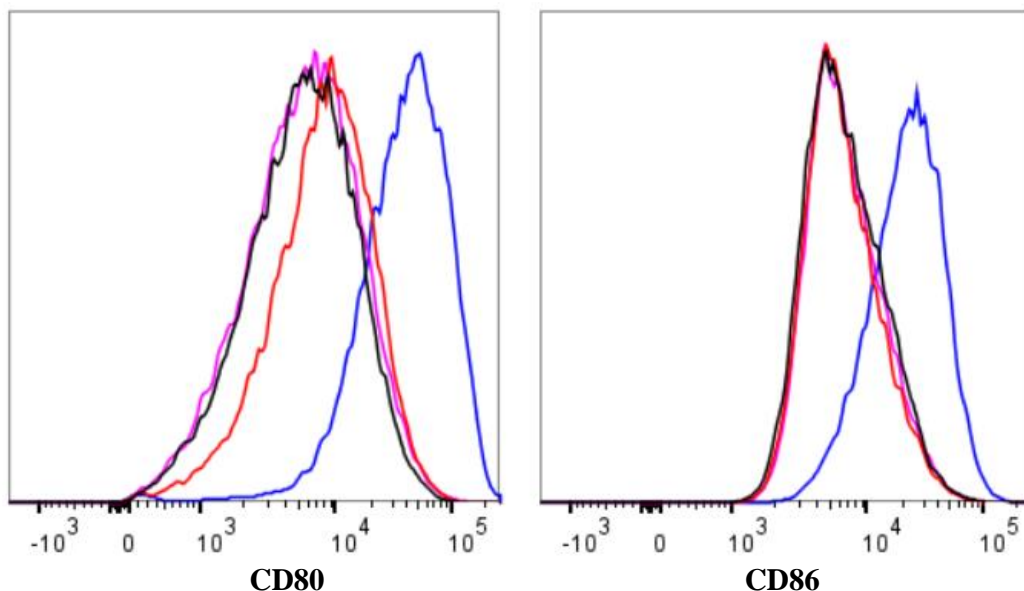


Abbildung 35: Exemplarische FACS-Histogramme der CD80 und CD86 Expression von Makrophagen abhängig von Eosinophilen

Dargestellt ist die Expression der M1-Marker CD80 (BV421) und CD86 (PE) in verschiedenen Koinkubationszenarien, schwarz: GM-CSF, blau: GM-CSF + LPS, IFN- γ , IL-6, rosa: GM-CSF + Überstand aktivierter Eosinophiler, rot: GM-CSF + IL-5 (Kontrolle)

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Inkubation mit LPS, IFN- γ und IL-6 (blau) zu einer vermehrten Expression von M1-Markern führte. Die Inkubation mit dem Überstand aktivierter Eosinophiler (grün) führte zu keinem erkennbaren Unterschied in der CD80- und CD86-Expression im Vergleich zu den Kontrollen (schwarz, rot).

den nur mit GM-CSF, den mit dem Überstand aktivierter Eosinophiler inkubierten Zellen und den Kontrollen (s. Abbildung 35). Nur die Zellen, die neben GM-CSF zusätzlich mit LPS, IFN- γ und IL-6 inkubiert wurden, zeigten einen Anstieg in der Expression der M1-Marker. Dies bestätigte die Verwertbarkeit dieses Assays.

Ebenso konnte auch kein polarisierender Effekt von Eosinophilen in Richtung M2-Makrophagen beobachtet werden (s. Abbildung 36). Die Expression der M2-Marker CD163 und CD206 der mit Eosinophilen-Überstand inkubierten Zellen entsprach der der Kontrollen bzw. der mit M-CSF inkubierten Ansätzen. Als Positivkontrolle dienten hier Ansätze, die mit IL-4, IL-13 und IL-6 inkubiert wurden. Diese zeigten einen deutlichen Anstieg der M2-Marker-Expression.

Kongruent zu den murinen FACS-Daten konnte unter humanen *in vitro* Bedingungen kein polarisierender Effekt der Eosinophilen auf die Makrophagen-Population nachgewiesen werden.

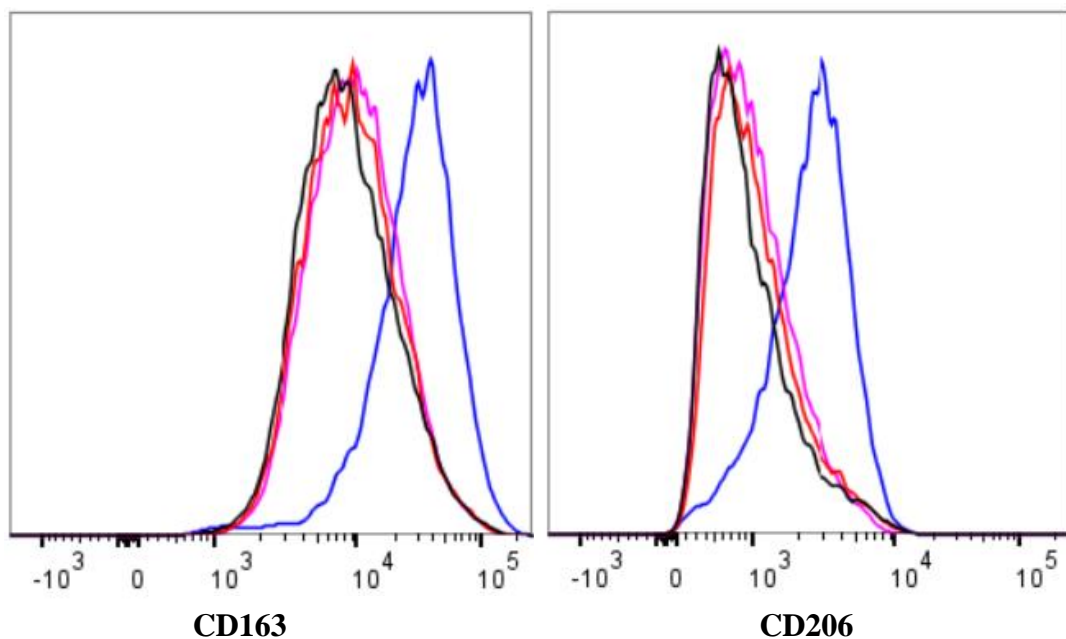


Abbildung 36: Exemplarische FACS- Histogramme der CD163 und CD206 Expression

Dargestellt ist die Expression der M2-Marker CD206 (PE-Cy7) und CD163 (PerCP-Cy5.5) in verschiedenen Koinkubationszenarien, schwarz: M-CSF, blau: M-CSF +IL-4, IL-13, IL-6, rosa: M-CSF + Überstand aktivierter Eosinophiler, rot: M-CSF + IL-5 (Kontrolle)

Auch hier war in den mit IL-4, IL-13 und IL-6 inkubierten Zellen (blau) ein deutlicher Anstieg in der M2-Marker-Expression zu erkennen. Die Inkubation mit dem Überstand aktivierter Eosinophiler (grün) zeigte auch hier keinen polarisierenden Effekt auf die Makrophagen. Die Histogramme sind nahezu kongruent zu denen der Kontrolle mit IL-5 (rot) und der Ansätze, die nur mit M-CSF (schwarz) inkubiert wurden.

3.3. IL-5 ELISA

IL-5 ist das Schlüsselzytokin von eosinophilen Granulozyten. IL-5 ist verantwortlich für die Proliferation, die Differenzierung, das Auswandern aus dem Knochenmark und das Überleben im Gewebe.

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde ein Anstieg der peripheren eosinophilen Granulozyten infolge eines Myokardinfarktes beobachtet. Um zu untersuchen, ob dieser Anstieg auf einen systemischen Anstieg von IL-5 zurückzuführen ist, wurde ein IL-5 ELISA aus Serumproben an Tag 2 und Tag 6 nach Myokardinfarkt sowie in Kontrolltieren ohne Infarkt durchgeführt. Dies wurde von Rios-Navarro *et al.* bereits in Schweinen und STEMI-Patienten beschrieben (10).

Wider Erwarten war in der Auswertung kein signifikanter Anstieg von IL-5 zu erkennen, weder 2 Tage noch 6 Tage nach Infarktinduktion (s. Abbildung 37A).

Interessanterweise kommt es in der Knockout-Gruppe zu einem kompensatorischen Anstieg von IL-5 (s. Abbildung 37B). Im *steady state* wies die Knockout-Gruppe mit 0,048 pg/ml eine um 50 % höhere IL-5 Konzentration auf als die Wildtyp-Gruppe. Der Effekt des genetischen Knockouts auf die IL-5 Konzentration ist stark (Cohen's $d = 1,70$) und der Mittelwertsunterschied statistisch signifikant ($p < 0,001$). An Tag 2 wies die Knockout-Gruppe ein um 93,1% höhere IL-5-Konzentration auf als die Kontrollgruppe. Dies lässt einen

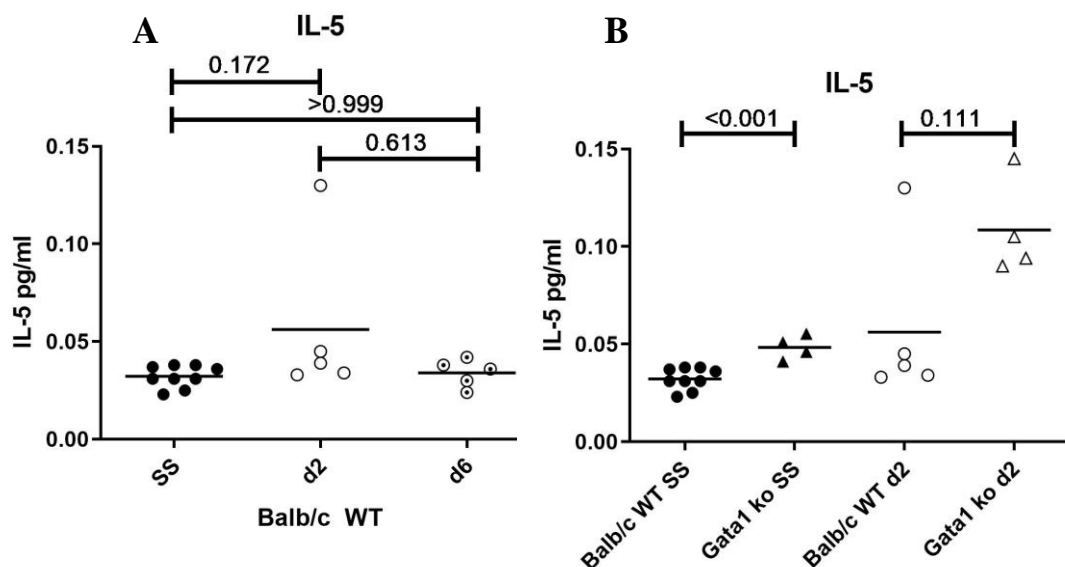


Abbildung 37: Ergebnisse IL-5 ELISA in Balb/c Mäusen im *steady state*, Tag 2 und Tag 6 nach Infarkt (A), Vergleich zur Δ blGATA1-Knockout-Gruppe im *steady state* und an Tag 2 (B)

A: Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multipler Testung, adjustierte p-Werte

B: *Steady state*: ungepaarter t-test, Tag 2: Mann-Whitney-U-Test

starken Effekt erkennen (Cohen's $d = 1,21$), der wegen eines Ausreißers in der Wildtyp-Gruppe jedoch nicht statistisch signifikant ist ($p = 0,111$). Es ist anzunehmen, dass ein größerer Stichprobenumfang zu einem statistisch signifikanten Unterschied führen würde.

3.4. Eotaxin-1 ELISA

Eotaxin-1 oder CCL11 ist ein wichtiges Chemokin für eosinophile Granulozyten. Rios-Navarro *et al.* konnten zeigen, dass es bei STEMI-Patienten zu einem deutlichen Abfall der Eotaxin-1 Konzentration im Blut kommt, dafür aber zu einem deutlichen Anstieg in der Genexpression im Herzen im Schweinmodell (10).

Zur Untersuchung wie sich die Eotaxin-1-Konzentration im Mausmodell verhält, wurde parallel zum IL-5 ELISA an Tag 2, Tag 6 und im *steady state* ein kommerzieller Eotaxin-1 ELISA durchgeführt.

Die Messung der Eotaxin-1-Konzentration im Blut zeigt ein ähnliches Bild wie die der IL-5-Konzentration. Es war weder ein Anstieg noch ein Abfall infolge eines Infarktes zu erkennen (s. Abbildung 38A). Wie bei IL-5 scheint es in den Knockout-Tieren zu einer kompensatorischen Überexpression zu kommen (Abbildung 38B). Im *steady state* lag die Eotaxin-1-Konzentration in den

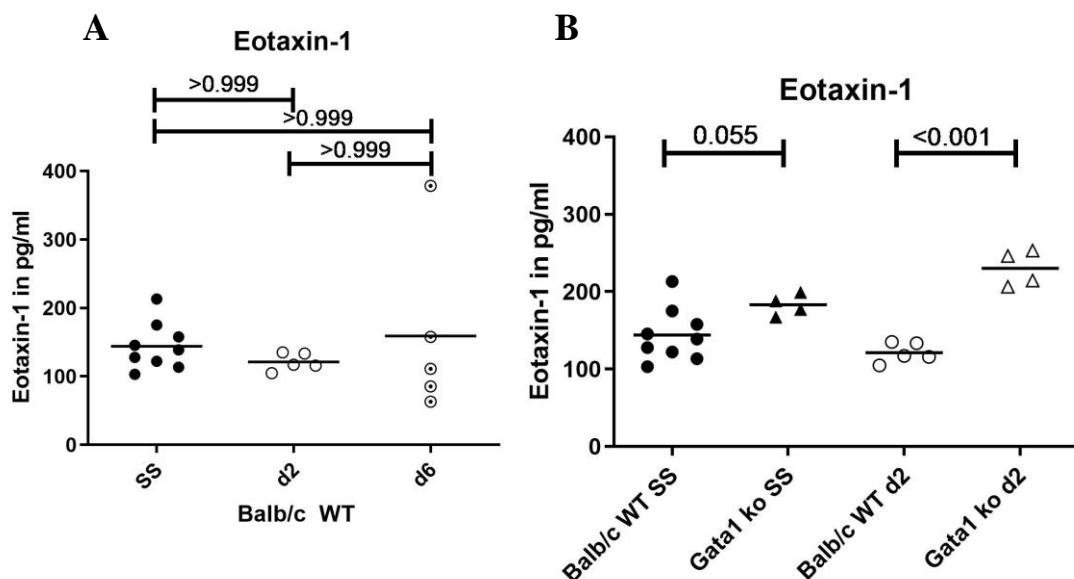


Abbildung 38: Ergebnisse Eotaxin-1 ELISA in Balb/c Mäusen im *steady state*, Tag 2 und Tag 6 nach Infarkt (A), Vergleich zur Gata1 Knockout-Gruppe an Tag 2 und Tag 6 (B)

A: Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multipler Testung, adjustierte p-Werte

B: ungepaarter t-test

Knockout-Tieren mit 180 pg/ml 26,9 % höher als in den Kontroll-Tieren (Cohen's $d = 1,13$, $p = 0,055$). An Tag 2 beträgt die Eotaxin-1-Konzentration in der Knockout-Gruppe 230 pg/ml und in der Kontroll-Gruppe 121,3 pg/ml. Das ist ein relativer Mittelwertsunterschied von 89,6 % (Cohen's $d = 1,82$, $p < 0,001$).

Wider Erwarten kam es weder bei IL-5 noch bei Eotaxin-1 zu einem systemischen Anstieg oder Abfall nach Infarktinduktion. Bemerkenswert ist jedoch, dass es in beiden Fällen durch den genetischen Knockout der Eosinophilenpopulation sowohl im gesunden Organismus als auch nach Infarktinduktion zu einer kompensatorischen Überexpression dieser Zytokine kommt.

VI. DISKUSSION

1. Diskussion des verwendeten Tiermodells

Zur Untersuchung der Rolle eosinophiler Granulozyten im akuten Myokardinfarkt wurde das Versuchstier Maus ausgewählt. Vorteile sind die Größe, das leichte Handling, kurze Reproduktionszyklen, das genaue Verständnis der murinen Immunologie und die Verfügbarkeit von Knockout- und Inzuchtlinien. Die fehlende genetische Variabilität bei Verwendung von Inzuchtlinien hat einerseits den Vorteil, dass sich schon bei geringen Gruppengrößen biologische Effekte ableiten lassen. Andererseits hat die geringe genetische Variabilität den Nachteil der geringen externen Validität, so dass die beobachteten Effekte nicht immer auf andere genetische Hintergründe oder gar Spezies übertragen werden können (177, 201).

Die Verwendung von Großtiermodellen, die in ihrer Anatomie, Physiologie und Metabolismus eher dem Menschen ähneln, kam aus Logistik- und Tierschutzgründen nicht infrage. Ein generelles Problem bei der Verwendung von Versuchstieren ist, dass man ein junges, gesundes Tier ohne Vor- oder Begleiterkrankung mit einem Patienten mittleren Alters mit Komorbiditäten und Komedikation vergleicht. Geschlecht, Alter, Risikofaktoren, Vorerkrankungen und Medikation haben großen Einfluss auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling. (202)

Die Arbeit mit genetisch modifizierten Organismen birgt immer das Risiko der Beeinträchtigung anderer Strukturen als der gewünschten. Die verwendete dblGata1-Linie ist jedoch eine gebräuchliche Mauslinie und der genetische Knockout vollständig charakterisiert (93). Die dblGata1-Tiere wurden auf einem Balb/c-Hintergrund gezüchtet. Entsprechend wurde mit Balb/c-Mäusen als Kontrollgruppe gearbeitet, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu garantieren.

Trotz einiger Einschränkungen lassen sich viele Erkenntnisse, vor allem in der Grundlagenforschung, von der Maus auf den Menschen übertragen. Aus genannten Gründen eignet sich die Maus daher hervorragend als Versuchstier in der kardiovaskulären Grundlagenforschung.

2. Diskussion der verwendeten Methode

2.1. OP-Methode

Es gibt verschiedene *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* Modelle zur Simulation eines akuten Myokardinfarktes. Zellbasierte *in vitro* Modelle haben den Vorteil, dass sie meist kostengünstig, schnell, hoch standardisierbar sind und meist weniger Versuchstiere bedürfen. Problematisch gestaltet sich jedoch die Gewinnung von primären Kardiomyozyten von Versuchstieren oder Patienten in ausreichender Menge. Die Verwendung von immortalisierten Zelllinien, neonatalen Kardiomyozyten oder induziert pluripotenten Stammzellen umgeht zwar diese Problematik, jedoch unterscheiden sich diese Zellen in ihrer Maturität, ihrem Sauerstoffverbrauch, ihrer Elektrophysiologie, ihrer Fähigkeit zur Proliferation und ihrer Signalübertragung von adulten Kardiomyozyten. Insgesamt können solche Modelle hinweisgebend sein, aber sie stellen nur sehr bedingt die pathophysiologische Komplexität eines Gesamtorganismus dar und kommen daher für das angestrebte Versuchsvorhaben nicht infrage. (203)

Ex vivo Modelle arbeiten meist mit isolierten, perfundierten Herzen von kleinen und großen Versuchstieren (204). Schon Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Langendorff-Apparatur erfunden, bei der ein isoliertes Herz retrograd mit Blut oder oxygeniertem Puffer perfundiert wurde (205). Das neuere, so genannte *working heart* Modell ermöglicht eine anterograde Perfusion mit präziser Kontrolle der Vorlast, Nachlast und Schlagfrequenz (206). Die Ischämie kann jetzt durch die Ligatur einer Koronararterie oder global durch Senkung der Flussgeschwindigkeit oder der Sauerstoffsättigung des Puffers erzielt werden. Diese Modelle sind gut standardisierbar und reproduzierbar und finden vor allem in der pharmakologischen Forschung zur Testung neuer Therapeutika Anwendung. Nichtsdestotrotz wird auch hier die Komplexität der systemischen Wechselwirkungen außenvorgelassen. Daher eignete sich ein solcher Versuchsaufbau nicht für das angestrebte Versuchsvorhaben (207). (203, 208)

In vivo Modelle, in denen meist die linke Koronararterie okkludiert und nach 30 bis 90 Minuten wiedereröffnet wird, spiegeln die klinischen Gegebenheiten eines akuten Myokardinfarkts mit anschließender Reperfusion durch perkutane Koronarintervention am besten wider. Die Okklusion der Koronararterie kann auf verschiedene Arten induziert werden: Die in dieser Arbeit verwendete linksseitige

Thorakotomie mit Eröffnung des Perikards und Ligatur der *left anterior descending artery* (LAD) ist die gebräuchlichste und einfachste Methode. Eine weniger invasive Alternative stellt die Okklusion der Koronararterie mittels Katheter und Angioplastieballon dar (209). Diese Herangehensweise birgt eine geringe post-operative Sterblichkeit, da kein chirurgisches Trauma gesetzt wird. Dennoch bedarf diese Methode größerer Expertise, Etablierung und entsprechender Apparaturen und wurde daher nicht angewendet. (203, 210)

Die Dauer der Ischämie hat einen entscheidenden Einfluss auf die myokardiale Nekrose, die Infarktgröße und das kardiale Remodeling. Eine permanente Ligatur der LAD simuliert einen permanenten Infarkt und hat ein größeres Nekrosegebiet und massivere Umbauvorgänge zur Folge. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde sich jedoch für eine transiente Ligatur entschieden, da es die klinischen Bedingungen am ehesten widerspiegelt und es durch die Reperfusion zu einer stärkeren Immunzellinfiltration kommt (211). Die Ischämie-Dauer von einer Stunde hat sich als zuverlässig herausgestellt, um einen myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden im Mausmodell zu setzen. Viele Studien messen die Infarktgröße bereits wenige Stunden nach Infarktinduktion und beenden den Versuch. Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf alle Phasen der Infarktheilung untersucht werden sollte, wurde ein verhältnismäßig später Endpunkt von 30 Tagen gewählt.

Die verwendete Methode kann zwar den Ischämie-Reperfusionsschaden gut simulieren, lässt aber die eigentliche klinische Ätiologie beim Menschen außer Acht. Ein Myokardinfarkt folgt meist auf die Ruptur einer vulnerablen atherosklerotischen Plaque, der meist eine jahrelange sterile Gefäßentzündung und womöglich eine ischämische Präkonditionierung der Kardiomyozyten vorausgeht. Auch die mikrovaskulären Obstruktionen infolge einer Katheterisierung, die die Infarktheilung negativ beeinflussen, können nicht simuliert werden. Andererseits lassen sich dadurch die beobachteten Effekte insoweit eingrenzen, als dass der Einfluss der Eosinophilen nicht in der Atherosklerose und Thrombogenese begründet zu sein scheint, welche Eosinophile auch beeinflussen (169).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die chirurgische Thorakotomie mit Ligatur der LAD eine sehr gute Methode darstellt, um einen akuten Myokardinfarkt im Mausmodell zu simulieren. Im Vergleich zur *in vitro* und

ex vivo Forschung weist sie zwar eine geringere Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit auf, dafür aber eine bedeutend höhere Repräsentativität und klinische Übertragbarkeit.

2.2. Untersuchung der Infarktgröße und der ventrikulären Funktion

Die Infarktgröße ist der wichtigste Parameter zur Evaluierung der Folgen eines akuten Myokardinfarkts. Die einfachste, zuverlässigste und kostengünstigste Methode zur Messung der Infarktgröße im Versuchstierbereich ist die *postmortem* Analyse mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (212). Entscheidender Nachteil ist die Tatsache, dass die Tiere dazu euthanasiert werden müssen und entsprechend keine longitudinalen Studien am selben Tier möglich sind. Es gibt eine Reihe von neueren nicht-invasiven Technologien zur Bestimmung der Infarktgröße und Herzfunktion, die serielle Messungen ermöglichen; darunter die Echokardiographie, Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT), die Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Nachteile im Versuchstierbereich sind die hohen Kosten, teilweise die Strahlenbelastung sowie technische Limitationen wie eine zu geringe räumliche und zeitliche Auflösung. (213)

Von der Echokardiographie ist bei Nagern abzuraten, da sie eine hohe intra- und interobserver Variabilität aufweist (214). Die Messwerte sind stark vom Handling der Sonde abhängig, sodass ein Untersucher-Bias schwerer auszuschließen ist als bei den nachfolgenden Methoden. Außerdem gestaltet es sich durch den geringen Zwischenrippenabstand bei Mäusen schwierig, ein gutes akustisches Fenster zu finden. Die MRT-Untersuchung ermöglicht eine genaue Messung der Herzfunktion, Wanddicke und Perfusion (215). Zusammen mit der SPECT gilt sie als Goldstandard für die Messung der ventrikulären Funktion. Ein entscheidender Nachteil im Kleintiermodell ist die geringe räumliche und zeitliche Auflösung, bei einer Herzfrequenz von 400-600 Schlägen pro Minute und einer Herzgröße von 8x5 mm (216). Der Nachteil bei CT-Studien ist der geringe Weichteilkontrast. Das für die Messungen für diese Forschungsarbeit verwendete ¹⁸FDG PET ist der Goldstandard zur Beurteilung der myokardialen Vitalität. Es ermöglicht die gleichzeitige Beurteilung des Infarktgebiets, der Herzfunktion und zusätzlich der metabolischen Aktivität des Myokards mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung (215). (213)

3. Diskussion der Ergebnisse

In Anbetracht der epidemiologischen Entwicklungen und der sozioökonomischen Folgen der ischämischen Herzkrankheit ist dieses Thema von hoher Relevanz und die weitere Forschung an therapeutischen Strategien unabdingbar. Dazu bedarf es eines genauen Verständnisses der zellulären Vorgänge in der Infarkttheilung und dem kardialen Remodeling. Ziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung des Einflusses von eosinophilen Granulozyten, einer Entzündungszellart, die im Krankheitskomplex des Myokardinfarkts bisher kaum erforscht wurde.

3.1. Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und Gewebepersistenz nach Myokardinfarkt

Diese Forschungsarbeit konnte zeigen, dass eosinophile Granulozyten das Ischämiegebiet infolge eines Herzinfarktes im Mausmodell infiltrieren. Die Analyse immunhistologischer Färbungen zeigt einen dynamischen Verlauf der Rekrutierung. Im gesunden Herzen waren keine Eosinophilen nachzuweisen. An Tag 2 waren Eosinophile im Infarktgebiet zu detektieren, deren Zahl an Tag 6 ihr Maximum erreichte und bis Tag 30 wieder abfiel. Unseres Wissens nach ist dies die erste Beschreibung der Eosinophilen-Rekrutierung im murinen Infarktmodell.

Dies erscheint besonders interessant unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Infiltration von eosinophilen Granulozyten im Infarktgebiet beim Menschen bereits 1978 von Fishbein *et al.* beschrieben wurde (175). Rios Navarro *et al.* untersuchten 2018 die Dynamik der Eosinophilen-Zahl im Blut von Patienten sowie im Blut und in Herzen von Schweinen. Ihre immunhistologischen Ergebnisse im Herzen decken sich mit den von uns erhobenen Daten. Die seriellen Blutuntersuchungen in Patienten und Schweinen zeigten einen dynamischen Verlauf mit einem deutlichen Anstieg der peripheren Eosinophilen während der Ischämie und einem drastischen Abfall nach der Reperfusion. Daraus lässt sich ableiten, dass die zirkulierenden eosinophilen Granulozyten nach der Reperfusion das Infarktgebiet infiltrieren. (10)

Die eosinophilen Granulozyten können an unterschiedlichen Zeit- und Ansatzpunkten in die Pathogenese und den Verlauf der Infarkttheilung eingreifen: in der Atherosklerose, in der Thrombogenese, in der Entzündungsphase oder in der proliferativen Phase. Da die experimentellen Ligatur-Modelle die Ischämie-Reperfusion ohne vorherige Atherosklerose und Thrombose induzieren, kann

davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Veränderungen im Phänotyp auf den eigentlichen Infarkt und seine Folgen zurückzuführen sind. Dies schließt natürlich nicht aus, dass eosinophile Granulozyten auch die sterile Entzündung in der Atherosklerose oder die Thrombogenese verstärken könnten.

Interessanterweise scheint die Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten ihren Höhepunkt in der proliferativen Phase an Tag 6 zu haben. Im Gegensatz dazu wandern die anderen angeborenen Immunzellen wie Neutrophilen und Monozyten vor allem in den ersten Tagen der Entzündungsphase ein. Bemerkenswert ist auch, dass an Tag 30 immer noch vereinzelt Eosinophile in der Infarktnarbe nachgewiesen werden konnten. Beides deutet darauf hin, dass der Einfluss von Eosinophilen in der späten inflammatorischen und der proliferativen Phase der Infarktheilung zu suchen ist.

3.2. Schädigender Effekt eosinophiler Granulozyten im Rahmen des linksventrikulären Remodelings

Die PET-Untersuchungen bestätigten diese Vermutung: So war in der Infarktgröße kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Eosinophilen-defizienten Knockout-Tieren zu erkennen (s.

Tabelle 3). Dies legt die Vermutung nahe, dass die eosinophilen Granulozyten nicht am Reperfusionsschaden selbst beteiligt sind. Ebenso ist anzunehmen, dass die Eosinophilen weniger durch ihre zytotoxischen Faktoren das Infarktgebiet schädigen oder vergrößern, sondern vielmehr durch ihre immunmodulatorischen Eigenschaften Einfluss auf das kardiale Remodeling nehmen. Dies wird besonders darin deutlich, dass in den linksventrikulären Funktionsparametern, die Parameter für das maladaptive Remodeling sind, signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout zu erkennen sind. Die beobachteten Effekte durch die genetische Defizienz der Eosinophilen akzentuierten sich in den meisten Fällen nochmals von Tag 6 zu Tag 30, was für einen langanhaltenden Effekt der Eosinophilen in alle Phasen der Infarktheilung spricht.

Die Kontrolltiere mit Eosinophilen zeigten eine signifikant schlechtere Pumpfunktion sowie einen Anstieg der linksventrikulären Dimensionen. Somit scheinen die eosinophilen Granulozyten das kardiale Remodeling so zu beeinflussen, dass es zu einer verminderten Kontraktilität und zu einer vermehrten Dilatation kommt.

Das metabolische Volumen ist ein Parameter zur Beurteilung der ventrikulären Hypertrophie, aber auch hinweisgebend für die reaktive Fibrose. An Tag 6 war noch kein Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren zu erkennen. Dies ist erwartungsgemäß, da die verbleibenden Kardiomyozyten erst im Laufe des kardialen Remodelings kompensatorisch hypertrophieren. An Tag 30 hingegen zeigten die Wildtyp-Tiere ein signifikant höheres LVMV im Vergleich zu den Knockout-Tieren. Daraus lässt sich ein potentieller Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf die kardiale Hypertrophie und Fibrose ableiten. Bei genauerer Betrachtung der Streuung fällt jedoch eine hohe Individualität in der Knockout-Gruppe auf (s.

Tabelle 3). Daher sollten diese Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden. Was dafür spricht, dass der beobachtete Effekt auf die Depletion von Eosinophilen und nicht auf individuelle Effekte zurückzuführen ist, ist die Tatsache, dass die Messung des LVMV mit den Ergebnissen der histologischen Quantifizierung der Fibrosefläche übereinstimmt. Auch hier zeigten die Wildtyp-Tiere an Tag 30 eine signifikant größere Fibrosefläche.

Es gibt eine Vielzahl an Möglichkeiten, wie eosinophile Granulozyten die Infarktheilung und das kardiale Remodeling beeinflussen können und wodurch sich die Unterschiede im Phänotyp zwischen Eosinophilen-defizienten Knockout- und den Kontrolltieren erklären lassen:

Eosinophile sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen, darunter TGF- β , Matrixmetalloproteinasen (MMPs), den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), mit denen sie die Fibrosierung und die Hypertrophie beeinflussen können. Viele andere mit Gewebe-Eosinophilie-assoziierte Erkrankungen, beispielsweise Asthma, die eosinophile Ösophagitis und Myokarditis, gehen mit Fibrosierung und Remodeling des entsprechenden Gewebes einher. Interessanterweise, konnten Aceves *et al.* zeigen, dass in der asthmatischen Lunge (141) und in der eosinophilen Ösophagitis (217) eosinophile Granulozyten die Hauptquelle von TGF- β 1 sind. Im Myokardinfarkt ist der prozentuale Anteil der Eosinophilen sehr viel geringer als in den oben genannten Erkrankungen. Trotzdem könnte die TGF- β 1-Produktion der Eosinophilen die Unterschiede in der Fibrosierung erklären.

Die histologische Quantifizierung der CD68-positiven Zellen, ergab in den Wildtyp-Tieren eine signifikant höhere Anzahl an Makrophagen in der *border zone*, jedoch keinen Unterschied im Infarktgebiet selbst. Dies lässt darauf schließen, dass eosinophile Granulozyten zwar einen chemotaktischen Effekt auf Monozyten ausüben, dieser jedoch indirekt über einen weiteren chemotaktischen Faktor funktioniert, der in der *border zone*, nicht aber im Infarktgebiet vorhanden ist.

Die Quantifizierung der Kapillardichte im Periinfarktbereich widersprach unserer anfänglichen Erwartungshaltung, die auf den proangiogenetischen Eigenschaften von Eosinophilen beruhte. So zeigten die Knockout-Mäuse eine signifikant höhere Gefäßdichte als die Wildtyp-Mäuse. Aus der verwendeten Methodik ist jedoch nicht zu erkennen, ob es sich bei den quantifizierten Gefäßen um neu eingesprossene Gefäße oder alte, vom Infarktgeschehen verschonte, Gefäße handelt. Eine Wiederholung des Versuchsaufbaus mit einer vorherigen Injektion des Proliferationsmarkers EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridin) könnte Aufschluss darüber geben, ob es sich um Neoangiogenese oder bestehende Gefäße handelt. Das Thymidin-Analogon EdU wird in die frisch synthetisierte DNS von Zellen eingebaut und kann über seine Fluoreszenz-Markierung sichtbar gemacht werden. So können proliferierende Gewebe von ruhenden Geweben unterschieden werden (218). Die bessere Gefäßversorgung im Periinfarktbereich könnte die maladaptiven Prozesse des kardialen Remodelings abdämpfen und so eine der Ursachen für die Unterschiede im Phänotyp sein. Ebenso könnte sie aber auch insgesamt für eine geringere Schädigung, geringere mikrovaskuläre Thrombose und eine verbesserte strukturelle Integrität der *border zone* in den Knockout-Tieren sprechen und so die Unterschiede im Phänotyp erklären.

Die Vermutung, dass eosinophile Granulozyten einen Einfluss auf die Chemotaxis, Polarisierung und das Überleben von Monozyten und Makrophagen haben könnte, wurde mittels Durchflusszytometrie und *in vitro* Experimenten weiter untersucht:

Die FACS-Untersuchungen der Eosinophilen bestätigte die Effektivität des genetischen Knockouts. In den $\Delta b1GATA1$ -Mäuse waren zu keinem Zeitpunkt und weder im Blut noch im Herzen Eosinophile zu detektieren. Die Beobachtung aus der Histologie, dass Eosinophile das infarzierte Herz infiltrieren, wurde damit bestätigt.

Im Blut kam es durch die Infarktinduktion bei den Eosinophilen, den Neutrophilen und den Monozyten zu einem signifikanten Anstieg der prozentualen Zellzahl an Tag 2 und zu einem Absinken bis Tag 6. Unterschiede in der Dynamik zwischen Wildtyp- und Knockout-Gruppe waren nicht zu erkennen. Die Ischämie-Reperfusion scheint somit einen systemischen Effekt zu haben. Der Anstieg der Entzündungszellen wird vermutlich in Teilen auch auf die Thorakotomie und die damit verbundene Entzündungsreaktion zurückzuführen sein.

Im Herzen kam es an Tag 2 nach der Ischämie-Reperfusion zu einem deutlichen Anstieg der Entzündungszellen. Erwartungsgemäß ist zu erkennen, dass mehr Entzündungszellen in den Apex mit dem Infarktgebiet einwanderten als in die nicht-infarzierte Herzbasis. Bei der Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten im Apex an Tag 2 waren in den Wildtyp-Tieren mehr Neutrophilen zu erkennen als in den Knockout-Tieren. Diese Tendenz war jedoch bei der geringen Gruppengröße nicht statistisch signifikant. Bei den Makrophagen hingegen war der Mittelwertunterschied statistisch signifikant. Diese Ergebnisse deckten sich mit der histologischen Quantifizierung der Makrophagen an Tag 30, bei der in den Wildtyp-Tieren auch mehr Makrophagen ausgezählt wurden. Insgesamt deutet dies auf einen direkten oder indirekten chemotaktischen Effekt durch die Eosinophilen hin. Dadurch könnten mehr Neutrophile und Monozyten das Infarktgebiet infiltrieren und die Entzündungsreaktion verstärken. Dies wäre ein möglicher Erklärungsversuch für die Unterschiede im kardialen Remodeling zwischen Tieren mit und ohne Eosinophile. Die chemotaktische Wirkung von Eosinophilen auf Monozyten könnte man *in vitro* in einem Chemotaxis-Assay bestätigen. Unterschiede in den Monozyten- und Makrophagen-Subpopulationen, die für einen polarisierenden Effekt durch die Eosinophilen sprechen würden, konnten weder durchflusszytometrisch noch *in vitro* festgestellt werden.

Auf der Suche nach Mechanismen, die die Unterschiede im Phänotyp und in der Entzündungszellrekrutierung erklären könnten, wurde die kardiale Zytokin-Expression untersucht. Dabei konnten mehrere Zytokine identifiziert werden, deren Expression sich zwischen Wildtyp- und Knockout-Gruppe unterschied:

In den Wildtyp-Tieren konnte eine erhöhte Konzentration von Amphiregulin, Chemerin, CXCL11, IL-11 und IL-33 detektiert werden. Amphiregulin (AREG) zählt zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren und wird neben

Epithelzellen auch von eosinophilen Granulozyten und anderen Immunzellen gebildet (219). Interessanterweise führt IL-33, dessen Konzentration in den Wildtyp-Tieren auch signifikant erhöht war, zu einer Erhöhung der Amphiregulin-Expression (220). Der ST2-Rezeptor für IL-33 wird unter anderem auf Eosinophilen exprimiert. So nimmt IL-33 Einfluss auf die Entwicklung und Aktivierung von Eosinophilen (221). IL-33 aktiviert Eosinophile, triggert deren Degranulation und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies – sogar potenter als IL-5 (222). Es ist beschrieben, dass Amphiregulin Immunreaktionen, Entzündungsprozesse und Gewebereparaturprozesse beeinflussen kann (223). In Verbindung mit TGF- β 1 scheint es an der Fibrosierung der Lunge und anderer Organe beteiligt zu sein (224). Im Zusammenhang der Lungenfibrose als Folge einer chronischen Asthma-Erkrankung beschreiben Morimoto *et al.*, dass T-Gedächtniszellen als Reaktion auf IL-33 vermehrt Amphiregulin sezernieren und so Eosinophile aktivieren (225). Diese produzieren als Reaktion auf das Amphiregulin vermehrt Osteopontin, ein wichtiges profibrotisches Zytokin. Liu, Jin *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass Amphiregulin auch infolge eines akuten Myokardinfarkts die kardiale Fibrose verstärkt und so die kardiale Funktion beeinträchtigt (226). Eine weitere aktuelle Studie von Tseng *et al.* zeigt, dass IL-33 und der korrespondierende ST2-Rezeptor im Herzversagen hochreguliert sind und mit dem Ausmaß der kardialen Fibrose korrelieren (227). Die Tatsache, dass sowohl IL-33 als auch Amphiregulin in den Wildtyp-Tieren mit Eosinophilen erhöht waren, legt die Vermutung nahe, dass dieser *Pathway* an der gesteigerten Fibrosierung in den Wildtyp-Tieren beteiligt sein könnte.

IL-11 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in verschiedenen Herzkreislauferkrankungen eine Rolle spielt. Klinische Studien zeigen, dass der IL-11 Spiegel infolge eines akuten Myokardinfarktes ansteigt und der Messwert mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse im chronischen Herzversagen korreliert (228). In chronischen Asthmaerkrankungen steht IL-11 im Verdacht, das Remodeling und die Fibrosierung der Lunge voranzutreiben (229). Al-Muhsen *et al.* konnten zeigen, dass besonders Eosinophile profibrotische Zytokine wie TGF- β und IL-11 in der asthmatischen Lunge produzieren (230). Ob IL-11 eine ähnliche Rolle im Infarktgeschehen einnimmt, ist unklar. Eine Veröffentlichung von Obana *et al.* zeigte gegensätzlich dazu, dass eine

Behandlung mit IL-11 die kardiale Fibrose im Mausmodell sogar eindämmt und die Herzfunktion verbessert (231).

Die Chemokine Chemerin und CXCL11 waren in den Wildtyp-Tieren signifikant erhöht. Chemerin ist ein kürzlich entdecktes Zytokin, das von der Leber und weißem Fettgewebe ausgeschüttet wird. Es beeinflusst die Differenzierung, Reifung und den Stoffwechsel von Adipozyten. Wittamer *et al.* konnten zeigen, dass Chemerin auch chemotaktisch auf dendritische Zellen und Makrophagen wirkt (232). Interessanterweise zeigte eine klinische Studie von Ateş *et al.*, dass das Plasma-Chemerin in STEMI Patienten erhöht ist und mit dem Ausmaß der Entzündung assoziiert ist (233). Ji *et al.* konnten eine positive Korrelation zwischen dem Chemerin-Plasmaspiegel und dem Entzündungsmarker CRP (C-reaktives Protein) sowie dem linksventrikulären enddiastolischen Volumen und eine negative Korrelation zur Ejektionsfraktion feststellen (234). Ähnliche Beobachtungen wie dieser Forschungsarbeit aus den PET-Studien zugrunde liegen. Sie schlagen Chemerin daher als zusätzlichen Biomarker zur Beurteilung eines akuten Myokardinfarkts vor. Dieser Zusammenhang könnte das erhöhte Entzündungszellinfiltrat in den Wildtyp-Tieren erklären, auch wenn nicht klar ist, über welche *Pathways* die Eosinophilen die Chemerin-Sekretion stimulieren.

CXCL11 wird als Chemokin für Th1-Zellen wahrgenommen. Der dazugehörige Rezeptor CXCR3 wird jedoch auch auf Monozyten, M1-Makrophagen, Eosinophilen und anderen Entzündungszellen exprimiert. Dem CXCR3-Rezeptor wird in kardiovaskulären Erkrankungen eine proinflammatorische Rolle zugeschrieben, die Rolle von CXCL11 im Infarktgeschehen ist jedoch nicht weiter erforscht (235). Es ist beschrieben, dass die Stimulation mit IFN- γ zu einer Erhöhung der Genexpression von CXCL11 in eosinophile Granulozyten führt, aber es konnte *in vitro* nicht gezeigt werden, dass sie dieses auch sezernieren (236). CXCL11, produziert durch Eosinophile, könnte zur Rekrutierung von Th1-Zellen führen, die weitere Entzündungszellen rekrutieren und so indirekt für die Chemotaxis von Monozyten und Makrophagen verantwortlich sein.

Über alle obigen Zytokine könnten Eosinophile Einfluss auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling nehmen. Es bedarf jedoch weiterer Forschung, um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen.

Ob es infolge einer transienten myokardialen Ischämie zu einem systemischen Anstieg von IL-5 und Eotaxin-1 kommt, der die Rekrutierung von Eosinophilen erklären könnte, wurde mithilfe eines ELISAs überprüft. Rios-Navarro *et al.* konnten aufzeigen, dass es im Schweinmodell und im Patienten zu einem Anstieg von IL-5, nicht aber von Eotaxin-1 kommt (10). Wider Erwarten kam es im Mausmodell weder an Tag 2 noch an Tag 6 nach Infarktinduktion zu einem Anstieg von IL-5 oder einem Abfall von Eotaxin-1. Und das obwohl durchflusszytometrisch ein Anstieg der peripheren Eosinophilen beobachtet worden war. Dies könnte auf die geringe Dauer der Ischämie und die geringe Sensitivität des ELISAs zurückzuführen sein, da IL-5 im Serum im einstelligen pg-Bereich gemessen wird.

Interessanterweise ergab die IL-5- und Eotaxin-1-Messung in den Knockout-Tieren signifikant höhere Werte als im Wildtyp. Dem liegt vermutlich das Fehlen eines negativen Feedbacks zugrunde. Bei beiden Mediatoren handelt es sich um recht Eosinophilen-spezifische Zytokine. Der IL-5-Rezeptor α kommt nur auf Eosinophilen, Basophilen und einer Unterart von Mastzellen vor (92). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hochregulierung – lokal oder systemisch – Einfluss auf die Infarktheilung hat. Ebenso ist unklar, ob auch andere weniger Eosinophilen-spezifische Mediatoren in den Knockout-Tieren kompensatorisch hochreguliert werden und so Einfluss auf den Phänotyp haben.

Insgesamt ist bemerkenswert, dass die meisten Effekte durch die genetische Defizienz der Eosinophilen groß sind. Zusammenfassend deuten die Daten auf einen negativen Effekt der eosinophilen Granulozyten auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling hin.

Es gibt bisher nur eine Studie von Toor *et al.*, in der ein ähnlicher Versuchsaufbau mit Koronarligatur bei Δ dblGATA1- und Balb/c durchgeführt wurde. Die Ergebnisse dieser Studie wurden auf dem *American Heart Association's 2016 Scientific Sessions and Resuscitation Science Symposium* vorgestellt (237) und bis heute nur auf einem Preprint-Server ohne Peer-Review veröffentlicht (238).

Im Kontrast zu unserer Datenlage zeigen sie jedoch einen positiven Effekt der eosinophilen Granulozyten auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling. Die Eosinophilen-defizienten Knockout-Tiere zeigten in der echokardiographischen Untersuchung eine signifikant schlechtere

Ejektionsfraktion und einen Anstieg im enddiastolischen Volumen an Tag 7 nach der Infarktinduktion. Diesen Effekt konnten sie in C57BL/6-Mäusen durch eine pharmakologische Depletion mit Siglec F anti-serum reproduzieren. Diese Studie weist jedoch zwei methodische Schwächen auf. Zum einen wurde eine permanente Ligatur der Koronararterie durchgeführt. Dies entspricht nicht den klinischen Bedingungen in der westlichen Welt, simuliert nicht den eigentlichen Ischämie-Reperfusionsschaden und führt zu einer verminderten Immunzellinfiltration ins Infarktgebiet. Die veränderte Zellkomposition im Infarktgebiet könnte die gegensätzlichen Ergebnisse erklären. Zum anderen hat die verwendete Bildgebung Schwächen (s.VI 2.2.). Der Herzultraschall beim Nager weist eine hohe intra- und interobserver Variabilität auf (214). Durch die Art der Messung entsteht die Gefahr des Untersucher-Bias. Außerdem ermöglicht die Sonographie keine verlässliche Beurteilung der Infarktgröße und des metabolischen Volumens. Ein weiterer Vorteil unseres Versuchsaufbaus ist die Tatsache, dass die Messungen zu zwei Zeitpunkten durchgeführt wurden und so den Verlauf des kardialen Remodelings ermöglichte.

Toor *et al.* beobachteten in der Durchflusszytometrie eine Reduktion der CD206-Expression, einem Marker für M2-Makrophagen in den Eosinophilen-defizienten Tieren. Sie vermuten eine mögliche IL-4 Sekretion durch Eosinophile als Ursache für diesen Shift im Makrophagen-Phänotyp. Durch die intraperitoneale Gabe von IL-4 24 h nach Infarktinduktion konnten sie in Δ dblGATA-Tieren die Auswurfleistung und ventrikuläre Dilatation verbessern. Auch hier gilt es wieder die methodischen Einschränkungen zu berücksichtigen. Generell ist die Einflussnahme über die Makrophagen-Polarisation ein interessanter Ansatz, dem wir sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgegangen sind. Durchflusszytometrisch konnten wir jedoch keinen Unterschied in den Makrophagen-Subpopulationen erkennen. In Koinkubationsversuchen mit Makrophagen und dem Überstand aktivierter Eosinophiler konnte ebenso kein polarisierender Effekt von Eosinophilen auf Makrophagen dargestellt werden.

In einer weiteren Studie über den prognostischen Wert der Anzahl der peripheren Eosinophilen nach einem akuten Myokardinfarkt widersprechen Toor *et al.* anderen retrospektiven Studien (239). Sie sehen eine inverse Korrelation zwischen der peripheren Eosinophilen-Zahl und dem Langzeitüberleben, d.h. je höher die Anzahl der Eosinophilen vor perkutaner Koronarintervention im Blut, desto

schlechter das Langzeitüberleben. Im Gegensatz dazu postulieren andere epidemiologischen Studien, dass je niedriger die peripheren Eosinophilen, desto schlechter das Langzeitüberleben (10, 12, 13). Diese Diskrepanz könnte sich einerseits auf die variierende Methodik, Untersuchungszeitpunkte und unterschiedliche Kohorten andererseits auf ein Bias zurückführen lassen.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Einflussnahme von Eosinophilen konnten in dieser Forschungsarbeit nur bedingt aufgeklärt werden. In anderen Tiermodellen, beispielsweise dem Schwein, könnte ein ähnlicher Versuchsaufbau durchgeführt werden, um die Beobachtungen zu bestätigen. Da es keine genetisch Eosinophilen-defiziente Schweinelinien gibt, könnte man die Eosinophilen pharmakologisch mithilfe eines monoklonalen IL-5-Antikörpers depletieren.

Um die Mechanismen der Einflussnahme besser zu verstehen, könnte man den Versuchsaufbau in einer genmodifizierten Mauslinie wiederholen, die Eosinophile überexprimiert (IL-5Tg). Ob die sekundären Granulaproteine einen Einfluss auf die Infarktheilung haben, könnte man beispielsweise in MBP- oder EPX-defizienten Mauslinien untersuchen. Ob die Degranulation oder die Ausbildung eosinophiler extrazellulärer Traps eine Rolle spielen, könnte man durch eine pharmakologische Inhibition ergründen.

Bei dieser Doktorarbeit handelt es sich um immunologische Grundlagenforschung. Im Mausmodell konnte ein negativer Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf das kardiale Remodeling gezeigt werden. Insgesamt ist jedoch zu berücksichtigen, dass viele kardioprotektive Strategien, die unter Laborbedingungen einen Effekt zeigen, in präklinischen und klinischen Studien jedoch enttäuschen (240). Daher bedarf es weiterer Forschung, um die pathophysiologische Komplexität der Infarktheilung und des kardialen Remodelings besser zu verstehen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling nach einem akuten Myokardinfarkt untersucht.

Nach einer transienten Koronarligatur zeigten die Eosinophilen-defizienten Tiere im PET zwar eine ähnliche Infarktgröße wie die Kontrollgruppe, aber signifikant bessere linksventrikulären Funktionsparameter sowie eine verringerte Ventrikeldilatation und Hypertrophie. Diese Effekte verstärkten sich über den Verlauf der Infarktheilung. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Eosinophilen weniger Einfluss auf den Ischämie-Reperfusionsschaden selbst als vielmehr auf den Prozess des kardialen Remodelings nehmen.

In den histologischen Untersuchungen wurde bestätigt, dass eosinophile Granulozyten das Infarktgebiet infiltrieren. Histologisch wiesen die Knockout-Tiere eine verminderte Fibrose, eine höhere Gefäßdichte und eine reduzierte Anzahl an Makrophagen im Perinfarktgebiet auf. Durchflusszytometrisch wurde die Immunzellkomposition im Blut und im Herzen untersucht und die Effektivität des genetischen Knockouts bestätigt. Im Blut war ein systemischer Anstieg der Eosinophilen, Neutrophilen und Monozyten nach Infarktinduktion zu detektieren. In der Dynamik der Immunzellkomposition war kein Unterschied zwischen Knockout- und Wildtypgruppe zu erkennen. Im Herzen konnte die Dynamik der Rekrutierung von Eosinophilen, Neutrophilen und Makrophagen infolge des Infarktes aufgezeigt werden. Die Wildtyp-Gruppe wies signifikant mehr Makrophagen auf als die Knockout-Gruppe. Dies deutet auf einen direkten oder indirekten chemotaktischen Effekt durch die eosinophilen Granulozyten hin.

Als potentielle Mechanismen konnten Zytokine und Chemokine ausgemacht werden, über die die Eosinophilen Einfluss auf die Immunzellrekrutierung und das kardiale Remodeling nehmen könnten. Hierbei bedarf es jedoch weiterer Forschung, um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen. Aus diesen Erkenntnissen könnten sich Strategien zur Behandlung des akuten Myokardinfarkts ableiten lassen, bei denen die Aktivierung eosinophiler Granulozyten beeinflusst wird.

VIII. SUMMARY

This study examined the role of eosinophils in infarct healing and cardiac remodeling after an acute myocardial infarction.

After a transient coronary artery ligation, in the PET study the eosinophil-deficient mice showed a similar infarct size as the control group, but significantly better left ventricular function and less dilatation and hypertrophy. This effect became more prominent during infarct healing until the second measurement. This implies that the eosinophils might not affect the ischemia reperfusion injury itself, but rather the maladaptive process of cardiac remodeling.

Histological analyses revealed that eosinophils infiltrate the infarcted myocardium. The eosinophil-deficient mice showed an attenuated myocardial fibrosis, a higher capillary density and less macrophages in the periinfarct region.

The inflammatory cell composition in the blood and in heart was analyzed using flow cytometry. After ischemia reperfusion injury a systemic rise in eosinophil, neutrophil and monocyte count could be detected in the blood. Apart from the lack of eosinophils, there was no difference in the dynamics of immune cells in the blood. In the heart, the dynamics of eosinophils, neutrophils and macrophages were analyzed after coronary artery ligation. The control group showed significantly more macrophages in the infarcted apex than the eosinophil-deficient group. This indicates a potential direct or indirect effect of the eosinophils on the recruitment of monocytes and macrophages and thereby an impact on infarct healing.

Using proteome analysis, potential cytokines, chemokines and pathways were identified, by which eosinophils could influence the immune cell recruitment and the cardiac remodeling. Further research needs to be conducted to better understand the underlying pathways of infarct healing and cardiac remodeling. These findings could lead to the development of therapeutic strategies for the treatment of acute myocardial infarction.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. World Health Organization Geneva S. Global Health Estimates 2016: Estimated deaths by cause and region, 2000 and 2016. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/. 2016.
2. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(1):1-25.
3. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;62:24-35.
4. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121(22):2437-45.
5. Jolly SR, Kane WJ, Hook BG, Abrams GD, Kunkel SL, Lucchesi BR. Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. *Am Heart J*. 1986;112(4):682-90.
6. Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med*. 2018;24(8):1234-45.
7. Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, Lee NA. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood*. 2012;120(19):3882-90.
8. Sakai T, Inoue S, Matsuyama TA, Takei M, Ota H, Katagiri T, et al. Eosinophils may be involved in thrombus growth in acute coronary syndrome. *Int Heart J*. 2009;50(3):267-77.
9. Diny NL, Baldeviano GC, Talor MV, Barin JG, Ong S, Bedja D, et al.

Eosinophil-derived IL-4 drives progression of myocarditis to inflammatory dilated cardiomyopathy. *J Exp Med.* 2017;214(4):943-57.

10. Rios-Navarro C, Gavara J, Vidal V, Bonanad C, Racugno P, Bayes-Genis A, et al. Characterization and implications of the dynamics of eosinophils in blood and in the infarcted myocardium after coronary reperfusion. *PLoS One.* 2018;13(10):e0206344.

11. Jiang P, Wang DZ, Ren YL, Cai JP, Chen BX. Significance of eosinophil accumulation in the thrombus and decrease in peripheral blood in patients with acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis.* 2015;26(2):101-6.

12. Konishi T, Funayama N, Yamamoto T, Morita T, Hotta D, Nishihara H, et al. Prognostic Value of Eosinophil to Leukocyte Ratio in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(8):827-40.

13. Shiyovich A, Gilutz H, Plakht Y. White Blood Cell Subtypes Are Associated with a Greater Long-Term Risk of Death after Acute Myocardial Infarction. *Tex Heart Inst J.* 2017;44(3):176-88.

14. Saleh M, Ambrose JA. Understanding myocardial infarction. *F1000Res.* 2018;7.

15. Niccoli G, Scalone G, Crea F. Acute myocardial infarction with no obstructive coronary atherosclerosis: mechanisms and management. *Eur Heart J.* 2015;36(8):475-81.

16. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Glob Heart.* 2012;7(4):275-95.

17. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.*

2017;376(21):2053-64.

18. Hermanides RS, Kilic S, van 't Hof AWJ. Optimal pharmacological therapy in ST-elevation myocardial infarction-a review : A review of antithrombotic therapies in STEMI. *Neth Heart J*. 2018;26(6):296-310.

19. Han X, Zhang Y, Yin L, Zhang L, Wang Y, Zhang H, et al. Statin in the treatment of patients with myocardial infarction: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(12):e0167.

20. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-77.

21. Antithrombotic Trialists C, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009;373(9678):1849-60.

22. Freemantle N, Cleland J, Young P, Mason J, Harrison J. beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ*. 1999;318(7200):1730-7.

23. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366(9493):1267-78.

24. Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K, et al. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.

Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. N Engl J Med. 1995;333(25):1670-6.

25. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. N Engl J Med. 1992;327(10):669-77.

26. Nguyen PK, Rhee JW, Wu JC. Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016: A Systematic Review. JAMA Cardiol. 2016;1(7):831-41.

27. Kloner RA. Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction. Circ Res. 2013;113(4):451-63.

28. Soehnlein O, Zernecke A, Weber C. Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. Thromb Haemost. 2009;102(2):198-205.

29. Frodermann V, Nahrendorf M. Neutrophil-macrophage cross-talk in acute myocardial infarction. Eur Heart J. 2017;38(3):198-200.

30. Phatharajaree W, Phrommintikul A, Chattipakorn N. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction. Can J Cardiol. 2007;23(9):727-33.

31. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(12):786-801.

32. Cahill TJ, Choudhury RP, Riley PR. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2017;16(10):699-717.

33. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in

myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53(1):31-47.

34. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-47.

35. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Ren G, Akrivakis S, Jackson PL, Michael LH, et al. MCSF expression is induced in healing myocardial infarcts and may regulate monocyte and endothelial cell phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H483-92.

36. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2177-87.

37. Forte E, Furtado MB, Rosenthal N. The interstitium in cardiac repair: role of the immune-stromal cell interplay. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(10):601-16.

38. Rog-Zielinska EA, Norris RA, Kohl P, Markwald R. The Living Scar--Cardiac Fibroblasts and the Injured Heart. *Trends Mol Med.* 2016;22(2):99-114.

39. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.* 2013;128(4):388-400.

40. Hutchins GM, Bulkley BH. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1978;41(7):1127-32.

41. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27(6):1281-92.

42. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res.* 1990;67(1):23-34.
43. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324(5923):98-102.
44. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000;101(25):2981-8.
45. Marino TA, Walter RA, Cobb E, Palasiuk M, Parsons T, Mercer WE. Effects of norepinephrine on neonatal rat cardiocyte growth and differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990;26(3 Pt 1):229-36.
46. Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1992;20(1):248-54.
47. Biernacka A, Frangogiannis NG. Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis.* 2011;2(2):158-73.
48. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* 1995;147(2):325-38.
49. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1285-342.
50. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:657-87.

51. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122(1):103-11.
52. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation.* 1997;96(11):4065-82.
53. Orn S, Manhenke C, Anand IS, Squire I, Nagel E, Edvardsen T, et al. Effect of left ventricular scar size, location, and transmuralty on left ventricular remodeling with healed myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2007;99(8):1109-14.
54. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation.* 1987;76(1):44-51.
55. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82.
56. Entman ML, Michael L, Rossen RD, Dreyer WJ, Anderson DC, Taylor AA, et al. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB J.* 1991;5(11):2529-37.
57. Ramos GC, van den Berg A, Nunes-Silva V, Weirather J, Peters L, Burkard M, et al. Myocardial aging as a T-cell-mediated phenomenon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(12):E2420-E9.
58. Liehn EA, Merx MW, Postea O, Becher S, Djalali-Talab Y, Shagdarsuren E, et al. Ccr1 deficiency reduces inflammatory remodelling and preserves left ventricular function after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2008;12(2):496-506.

59. Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, et al. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med.* 1999;190(12):1733-40.
60. Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, et al. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(11):2281-9.
61. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):738-47.
62. Liehn EA, Postea O, Curaj A, Marx N. Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(23):2357-62.
63. Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Drechsler M, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J.* 2017;38(3):187-97.
64. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007;117(4):902-9.
65. Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, et al. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(2):130-8.
66. van der Laan AM, Ter Horst EN, Delewi R, Begieneman MP, Krijnen PA, Hirsch A, et al. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J.* 2014;35(6):376-85.

67. Ishibashi M, Hiasa K, Zhao Q, Inoue S, Ohtani K, Kitamoto S, et al. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling. *Circ Res.* 2004;94(9):1203-10.
68. Azzawi M, Kan SW, Hillier V, Yonan N, Hutchinson IV, Hasleton PS. The distribution of cardiac macrophages in myocardial ischaemia and cardiomyopathy. *Histopathology.* 2005;46(3):314-9.
69. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res.* 2013;112(12):1624-33.
70. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity.* 2014;40(1):91-104.
71. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature.* 2015;518(7540):547-51.
72. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012;336(6077):86-90.
73. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(12):733-44.
74. Pinto AR, Paolicelli R, Salimova E, Gospocic J, Slonimsky E, Bilbao-Cortes D, et al. An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS One.* 2012;7(5):e36814.

75. Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ Res*. 2014;115(2):284-95.
76. Frieler RA, Mortensen RM. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation*. 2015;131(11):1019-30.
77. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*. 2014;159(6):1312-26.
78. Nahrendorf M, Swirski FK. Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res*. 2016;119(3):414-7.
79. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-40.
80. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.
81. Troidl C, Mollmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, et al. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3485-96.
82. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol*. 2007;170(3):818-29.
83. Shiraishi M, Shintani Y, Shintani Y, Ishida H, Saba R, Yamaguchi A, et al. Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2151-66.

84. Kaikita K, Hayasaki T, Okuma T, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2004;165(2):439-47.
85. Shintani Y, Ito T, Fields L, Shiraishi M, Ichihara Y, Sato N, et al. IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):6877.
86. Kay AB. The early history of the eosinophil. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(3):575-82.
87. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):9-22.
88. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:147-74.
89. Diny NL, Rose NR, Cihakova D. Eosinophils in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:484.
90. McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:93.
91. Boyce JA, Friend D, Matsumoto R, Austen KF, Owen WF. Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J Exp Med.* 1995;182(1):49-57.
92. Fulkerson PC. Transcription Factors in Eosinophil Development and As Therapeutic Targets. *Frontiers in Medicine.* 2017;4.
93. Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y, et al.

Targeted Deletion of a High-Affinity GATA-binding Site in the GATA-1 Promoter Leads to Selective Loss of the Eosinophil Lineage In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(11):1387-95.

94. Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, et al. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med*. 2002;195(11):1379-86.

95. Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood*. 1998;91(7):2240-8.

96. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res*. 2001;2(2):71-9.

97. Roufosse F. Targeting the Interleukin-5 Pathway for Treatment of Eosinophilic Conditions Other than Asthma. *Frontiers in Medicine*. 2018;5.

98. Bao K, Reinhardt RL. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine*. 2015;75(1):25-37.

99. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, et al. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med*. 1994;179(2):703-8.

100. Molfino NA, Gossage D, Kolbeck R, Parker JM, Geba GP. Molecular and clinical rationale for therapeutic targeting of interleukin-5 and its receptor. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(5):712-37.

101. Farne HA, Wilson A, Powell C, Bax L, Milan SJ. Anti-IL5 therapies for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;9:CD010834.

102. Shardonofsky. Therapeutic efficacy of an anti-IL-5.
103. Spergel JM, Rothenberg ME, Collins MH, Furuta GT, Markowitz JE, Fuchs G, 3rd, et al. Reslizumab in children and adolescents with eosinophilic esophagitis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):456-63, 63 e1-3.
104. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9095275.
105. Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(5):923-32; quiz 33.
106. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem*. 2014;289(25):17406-15.
107. Nusse O, Lindau M, Cromwell O, Kay AB, Gomperts BD. Intracellular application of guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) induces exocytotic granule fusion in guinea pig eosinophils. *J Exp Med*. 1990;171(3):775-86.
108. Scepek S, Moqbel R, Lindau M. Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and their role in parasite killing. *Parasitol Today*. 1994;10(7):276-8.
109. Dvorak AM, Ackerman SJ, Furitsu T, Estrella P, Letourneau L, Ishizaka T. Mature eosinophils stimulated to develop in human-cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin-5. II. Vesicular transport of specific granule matrix peroxidase, a mechanism for effecting piecemeal degranulation. *Am J Pathol*. 1992;140(4):795-807.
110. Saffari H, Hoffman LH, Peterson KA, Fang JC, Leiferman KM, Pease LF,

3rd, et al. Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1728-34 e1.

111. Erjefalt JS, Greiff L, Andersson M, Matsson E, Petersen H, Linden M, et al. Allergen-induced eosinophil cytotoxicity is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):304-12.

112. Erjefalt JS, Andersson M, Greiff L, Korsgren M, Gizycki M, Jeffery PK, et al. Cytotoxicity and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(2):286-94.

113. Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, Schleimer RP, Lee NA. Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(4):563-75.

114. Sferruzzi-Perri AN, Robertson SA, Dent LA. Interleukin-5 transgene expression and eosinophilia are associated with retarded mammary gland development in mice. *Biol Reprod*. 2003;69(1):224-33.

115. Robertson SA, Mau VJ, Young IG, Matthaei KI. Uterine eosinophils and reproductive performance in interleukin 5-deficient mice. *J Reprod Fertil*. 2000;120(2):423-32.

116. Nagral A, Quaglia A, Sabin CA, Dhillon AP, Bearcroft CP, Millar A, et al. Blood and graft eosinophils in acute cellular rejection of liver allografts. *Transplant Proc*. 2001;33(4):2588-93.

117. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science*. 1992;257(5069):548-51.

118. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):57-83.

119. Long H, Liao W, Wang L, Lu Q. A Player and Coordinator: The Versatile Roles of Eosinophils in the Immune System. *Transfus Med Hemother*. 2016;43(2):96-108.
120. Phipps S, Lam CE, Mahalingam S, Newhouse M, Ramirez R, Rosenberg HF, et al. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood*. 2007;110(5):1578-86.
121. Linch SN, Kelly AM, Danielson ET, Pero R, Lee JJ, Gold JA. Mouse eosinophils possess potent antibacterial properties in vivo. *Infect Immun*. 2009;77(11):4976-82.
122. Archer GT, Hirsch JG. Motion Picture Studies on Degranulation of Horse Eosinophils during Phagocytosis. *J Exp Med*. 1963;118:287-94.
123. Hatano Y, Taniuchi S, Masuda M, Tsuji S, Ito T, Hasui M, et al. Phagocytosis of heat-killed *Staphylococcus aureus* by eosinophils: comparison with neutrophils. *APMIS*. 2009;117(2):115-23.
124. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008;14(9):949-53.
125. Matthey DL, Dawes PT, Nixon NB, Slater H. Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(7):426-31.
126. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2005;166(5):1321-32.

127. Chen G, Khalil N. TGF-beta1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respir Res.* 2006;7:2.
128. Woerly G, Lacy P, Younes AB, Roger N, Loiseau S, Moqbel R, et al. Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. *J Leukoc Biol.* 2002;72(4):769-79.
129. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004;4(2):123-31.
130. Lee JJR, H.F. Eosinophils in Health and Disease: Elsevier; 2013.
131. Rochester CL, Ackerman SJ, Zheng T, Elias JA. Eosinophil-fibroblast interactions. Granule major basic protein interacts with IL-1 and transforming growth factor-beta in the stimulation of lung fibroblast IL-6-type cytokine production. *J Immunol.* 1996;156(11):4449-56.
132. Zagai U, Lundahl J, Klominek J, Venge P, Skold CM. Eosinophil cationic protein stimulates migration of human lung fibroblasts in vitro. *Scand J Immunol.* 2009;69(4):381-6.
133. Zagai U, Dadfar E, Lundahl J, Venge P, Skold CM. Eosinophil cationic protein stimulates TGF-beta1 release by human lung fibroblasts in vitro. *Inflammation.* 2007;30(5):153-60.
134. Hernnas J, Sarnstrand B, Lindroth P, Peterson CG, Venge P, Malmstrom A. Eosinophil cationic protein alters proteoglycan metabolism in human lung fibroblast cultures. *Eur J Cell Biol.* 1992;59(2):352-63.
135. Pegorier S, Wagner LA, Gleich GJ, Pretolani M. Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. *J Immunol.* 2006;177(7):4861-9.

136. Wehling-Henricks M, Sokolow S, Lee JJ, Myung KH, Villalta SA, Tidball JG. Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2008;17(15):2280-92.
137. Fukuda T, Iwata M, Kitazoe M, Maeda T, Salomon D, Hirohata S, et al. Human eosinophil cationic protein enhances stress fiber formation in Balb/c 3T3 fibroblasts and differentiation of rat neonatal cardiomyocytes. *Growth Factors.* 2009;27(4):228-36.
138. Dahlen B, Shute J, Howarth P. Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 within the airways in asthma. *Thorax.* 1999;54(7):590-6.
139. Mori S, Pawankar R, Ozu C, Nonaka M, Yagi T, Okubo K. Expression and Roles of MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, and TIMP-2 in Allergic Nasal Mucosa. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2012;4(4):231-9.
140. Puxeddu I, Berkman N, Nissim Ben Efraim AH, Davies DE, Ribatti D, Gleich GJ, et al. The role of eosinophil major basic protein in angiogenesis. *Allergy.* 2009;64(3):368-74.
141. Aceves SS, Broide DH. Airway fibrosis and angiogenesis due to eosinophil trafficking in chronic asthma. *Curr Mol Med.* 2008;8(5):350-8.
142. Fulkerson PC, Fischetti CA, Rothenberg ME. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling. *Am J Pathol.* 2006;169(6):2117-26.
143. Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(3):560-70; quiz 71-2.

144. Aceves SS. Remodeling and fibrosis in chronic eosinophil inflammation. *Dig Dis.* 2014;32(1-2):15-21.
145. Berek C. Eosinophils: important players in humoral immunity. *Clin Exp Immunol.* 2016;183(1):57-64.
146. Jacobsen EA, Ochkur SI, Pero RS, Taranova AG, Protheroe CA, Colbert DC, et al. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med.* 2008;205(3):699-710.
147. Wong TW, Doyle AD, Lee JJ, Jelinek DF. Eosinophils regulate peripheral B cell numbers in both mice and humans. *J Immunol.* 2014;192(8):3548-58.
148. Chu VT, Frohlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol.* 2011;12(2):151-9.
149. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science.* 2011;332(6026):243-7.
150. Piehler D, Stenzel W, Grahnert A, Held J, Richter L, Kohler G, et al. Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. *Am J Pathol.* 2011;179(2):733-44.
151. Shi HZ. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):520-7.
152. Varricchi G, Senna G, Loffredo S, Bagnasco D, Ferrando M, Canonica GW. Reslizumab and Eosinophilic Asthma: One Step Closer to Precision Medicine? *Front Immunol.* 2017;8:242.

153. Ogbogu PU, Rosing DR, Horne MK, 3rd. Cardiovascular manifestations of hypereosinophilic syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27(3):457-75.
154. Comarmond C, Pagnoux C, Khellaf M, Cordier JF, Hamidou M, Viallard JF, et al. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss): clinical characteristics and long-term followup of the 383 patients enrolled in the French Vasculitis Study Group cohort. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):270-81.
155. Bourgeois GP, Cafardi JA, Groysman V, Hughey LC. A review of DRESS-associated myocarditis. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(6):e229-36.
156. Shibazaki S, Eguchi S, Endo T, Wakabayashi T, Araki M, Gu Y, et al. Eosinophilic Myocarditis due to Toxocariasis: Not a Rare Cause. *Case Rep Cardiol.* 2016;2016:2586292.
157. Ammirati E, Stucchi M, Brambatti M, Spano F, Bonacina E, Recalcati F, et al. Eosinophilic myocarditis: a paraneoplastic event. *Lancet.* 2015;385(9986):2546.
158. Brambatti M, Matassini MV, Adler ED, Klingel K, Camici PG, Ammirati E. Eosinophilic Myocarditis: Characteristics, Treatment, and Outcomes. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(19):2363-75.
159. Diny NL, Hou X, Barin JG, Chen G, Talor MV, Schaub J, et al. Macrophages and cardiac fibroblasts are the main producers of eotaxins and regulate eosinophil trafficking to the heart. *Eur J Immunol.* 2016;46(12):2749-60.
160. Kanellakis P, Ditiatkovski M, Kostolias G, Bobik A. A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload. *Cardiovasc Res.* 2012;95(1):77-85.
161. Moosig F, Richardt G, Gross WL. A fatal attraction: eosinophils and the heart. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(4):587-9.

162. Shah SA, Page CP, Pitchford SC. Platelet-Eosinophil Interactions As a Potential Therapeutic Target in Allergic Inflammation and Asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:129.
163. Speth CL, J; Krappmann S.; Lass-Flörl C, Rambach G. Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbol*. 2013;8 (11):1431-51.
164. Jawien J, Chlopicki S, Gryglewski RJ. Interactions between human platelets and eosinophils are mediated by selectin-P. *Pol J Pharmacol*. 2002;54(2):157-60.
165. Rohrbach MS, Wheatley CL, Slifman NR, Gleich GJ. Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *J Exp Med*. 1990;172(4):1271-4.
166. Slungaard A, Vercellotti GM, Tran T, Gleich GJ, Key NS. Eosinophil cationic granule proteins impair thrombomodulin function. A potential mechanism for thromboembolism in hypereosinophilic heart disease. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1721-30.
167. Moosbauer C, Morgenstern E, Cuvelier SL, Manukyan D, Bidzhekov K, Albrecht S, et al. Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood*. 2007;109(3):995-1002.
168. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819-35.
169. Marx C, Novotny J, Salbeck D, Zellner KR, Nicolai L, Pekayvaz K, et al. Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis by eosinophil extracellular traps. *Blood*. 2019.
170. Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, et al. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using

genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation*. 2000;102(18):2185-9.

171. Tanaka M, Fukui M, Tomiyasu K, Akabame S, Nakano K, Yamasaki M, et al. Eosinophil count is positively correlated with coronary artery calcification. *Hypertens Res*. 2012;35(3):325-8.

172. Niccoli G, Ferrante G, Cosentino N, Conte M, Belloni F, Marino M, et al. Eosinophil cationic protein: A new biomarker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010;211(2):606-11.

173. Niccoli G, Cosentino N. Eosinophils: a new player in coronary atherosclerotic disease. *Hypertens Res*. 2012;35(3):269-71.

174. Uderhardt S, Ackermann JA, Fillep T, Hammond VJ, Willeit J, Santer P, et al. Enzymatic lipid oxidation by eosinophils propagates coagulation, hemostasis, and thrombotic disease. *J Exp Med*. 2017;214(7):2121-38.

175. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest*. 1978;73(6):843-9.

176. Shih-Feng T. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes & Development*.

177. van den Borne SW, van de Schans VA, Strzelecka AE, Vervoort-Peters HT, Lijnen PM, Cleutjens JP, et al. Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2009;84(2):273-82.

178. Walkin L, Herrick SE, Summers A, Brenchley PE, Hoff CM, Korstanje R, et al. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6(1):18.

179. Kolk MV, Meyberg D, Deuse T, Tang-Quan KR, Robbins RC, Reichenspurner H, et al. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *J Vis Exp*. 2009(32).
180. Gross L, Paintmayer L, Lehner S, Brandl L, Brenner C, Grabmaier U, et al. FDG-PET reveals improved cardiac regeneration and attenuated adverse remodelling following Sitagliptin + G-CSF therapy after acute myocardial infarction. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2016;17(2):136-45.
181. Ghosh N, Rimoldi OE, Beanlands RS, Camici PG. Assessment of myocardial ischaemia and viability: role of positron emission tomography. *Eur Heart J*. 2010;31(24):2984-95.
182. Baks T, van Geuns RJ, Biagini E, Wielopolski P, Mollet NR, Cademartiri F, et al. Recovery of left ventricular function after primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2005;26(11):1070-7.
183. Slomka P, Xu Y, Berman D, Germano G. Quantitative analysis of perfusion studies: strengths and pitfalls. *J Nucl Cardiol*. 2012;19(2):338-46.
184. Schinkel AF, Bax JJ, Poldermans D, Elhendy A, Ferrari R, Rahimtoola SH. Hibernating myocardium: diagnosis and patient outcomes. *Curr Probl Cardiol*. 2007;32(7):375-410.
185. Brunner S, Todica A, Boning G, Nekolla SG, Wildgruber M, Lehner S, et al. Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [18 F]FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy. *EJNMMI Res*. 2012;2(1):43.
186. Lindsey ML, Kassiri Z, Virag JAI, de Castro Bras LE, Scherrer-Crosbie M. Guidelines for measuring cardiac physiology in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(4):H733-H52.

187. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4(1):98-108.
188. Todica A, Beetz NL, Gunther L, Zacherl MJ, Grabmaier U, Huber B, et al. Monitoring of Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Pressure-Overload Left Ventricular Hypertrophy with [(18)F]FDG MicroPET. *Mol Imaging Biol*. 2018;20(2):268-74.
189. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016;23(3):253-9.
190. Holness CL, da Silva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL. Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J Biol Chem*. 1993;268(13):9661-6.
191. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993;81(6):1607-13.
192. Emde B, Heinen A, Gödecke A, Bottermann K. Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction. *European Journal of Histochemistry*. 2014;58(4).
193. Bio-Techne. Proteome Profiler Antibody Arrays Brochure. 2019.
194. Hansel TT, De Vries IJ, Iff T, Rihs S, Wandzilak M, Betz S, et al. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods*. 1991;145(1-2):105-10.
195. Percopo CM, Dyer KD, Killoran KE, Rosenberg HF. Isolation of human

eosinophils: microbead method has no impact on IL-5 sustained viability. *Exp Dermatol*. 2010;19(5):467-9.

196. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 1976;Suppl 5:9-15.

197. Dyer KD, Percopo CM, Xie Z, Yang Z, Kim JD, Davoine F, et al. Mouse and human eosinophils degranulate in response to platelet-activating factor (PAF) and lysoPAF via a PAF-receptor-independent mechanism: evidence for a novel receptor. *J Immunol*. 2010;184(11):6327-34.

198. FIo RW, Neess, Are, Lund-Johansen, Fridtjof , O. Meehle, Bjern, 1 aCOS. Negative selection of human monocytes using magnetic particles covered by anti-lymphocyte antibodies. *Journal of Immunological Methods*. 1991;137 (1991).

199. Zarif JC, Hernandez JR, Verdone JE, Campbell SP, Drake CG, Pienta KJ. A phased strategy to differentiate human CD14+monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells. *Biotechniques*. 2016;61(1):33-41.

200. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers 1988.

201. Barnabei MS, Palpant NJ, Metzger JM. Influence of genetic background on ex vivo and in vivo cardiac function in several commonly used inbred mouse strains. *Physiol Genomics*. 2010;42A(2):103-13.

202. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev*. 2014;66(4):1142-74.

203. Lecour S, Botker HE, Condorelli G, Davidson SM, Garcia-Dorado D,

Engel FB, et al. ESC working group cellular biology of the heart: position paper: improving the preclinical assessment of novel cardioprotective therapies. *Cardiovasc Res.* 2014;104(3):399-411.

204. Schuster A, Grunwald I, Chiribiri A, Southworth R, Ishida M, Hay G, et al. An isolated perfused pig heart model for the development, validation and translation of novel cardiovascular magnetic resonance techniques. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2010;12:53.

205. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(6):940-50.

206. DeWitt ES, Black KJ, Kheir JN. Rodent Working Heart Model for the Study of Myocardial Performance and Oxygen Consumption. *J Vis Exp.* 2016(114).

207. Ludman AJ, Yellon DM, Hausenloy DJ. Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation. *Dis Model Mech.* 2010;3(1-2):35-8.

208. Chen T, Vunjak-Novakovic G. In vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regen Eng Transl Med.* 2018;4(3):142-53.

209. Crisostomo V, Maestre J, Maynar M, Sun F, Baez-Diaz C, Uson J, et al. Development of a closed chest model of chronic myocardial infarction in Swine: magnetic resonance imaging and pathological evaluation. *ISRN Cardiol.* 2013;2013:781762.

210. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74(1):29-38.

211. Vandervelde S, van Amerongen MJ, Tio RA, Petersen AH, van Luyn MJ, Harmsen MC. Increased inflammatory response and neovascularization in

reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(2):83-90.

212. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J.* 1981;101(5):593-600.

213. Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novak G, Fekete V, Bencsik P, et al. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61(2):163-70.

214. Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, et al. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation.* 1996;94(5):1109-17.

215. Thomas D, Bal H, Arkles J, Horowitz J, Araujo L, Acton PD, et al. Noninvasive assessment of myocardial viability in a small animal model: comparison of MRI, SPECT, and PET. *Magn Reson Med.* 2008;59(2):252-9.

216. Ojha N, Roy S, Radtke J, Simonetti O, Gnyawali S, Zweier JL, et al. Characterization of the structural and functional changes in the myocardium following focal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(6):H2435-43.

217. Aceves SS, Newbury RO, Dohil R, Bastian JF, Broide DH. Esophageal remodeling in pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(1):206-12.

218. Mead TJ, Lefebvre V. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections. *Methods Mol Biol.* 2014;1130:233-43.

219. Matsumoto K, Fukuda S, Nakamura Y, Saito H. Amphiregulin production

by human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;149 Suppl 1:39-44.

220. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med.* 2013;210(13):2939-50.

221. Johnston LK, Bryce PJ. Understanding Interleukin 33 and Its Roles in Eosinophil Development. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:51.

222. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(6):1484-90.

223. Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, Artis D. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity.* 2015;42(2):216-26.

224. Zhou Y, Lee JY, Lee CM, Cho WK, Kang MJ, Koff JL, et al. Amphiregulin, an epidermal growth factor receptor ligand, plays an essential role in the pathogenesis of transforming growth factor-beta-induced pulmonary fibrosis. *J Biol Chem.* 2012;287(50):41991-2000.

225. Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, Wada T, Ichikawa T, Kanno T, et al. Amphiregulin-Producing Pathogenic Memory T Helper 2 Cells Instruct Eosinophils to Secrete Osteopontin and Facilitate Airway Fibrosis. *Immunity.* 2018;49(1):134-50 e6.

226. Liu L, Jin X, Hu CF, Zhang YP, Zhou Z, Li R, et al. Amphiregulin enhances cardiac fibrosis and aggravates cardiac dysfunction in mice with experimental myocardial infarction partly through activating EGFR-dependent pathway. *Basic Res Cardiol.* 2018;113(2):12.

227. Tseng CCS, Huibers MMH, van Kuik J, de Weger RA, Vink A, de Jonge

N. The Interleukin-33/ST2 Pathway Is Expressed in the Failing Human Heart and Associated with Pro-fibrotic Remodeling of the Myocardium. *J Cardiovasc Transl Res.* 2018;11(1):15-21.

228. Ye J, Wang Z, Ye D, Wang Y, Wang M, Ji Q, et al. Increased Interleukin-11 Levels Are Correlated with Cardiac Events in Patients with Chronic Heart Failure. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:1575410.

229. Minshall E, Chakir J, Laviolette M, Molet S, Zhu Z, Olivenstein R, et al. IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(2 Pt 1):232-8.

230. Al-Muhsen S, Letuve S, Vazquez-Tello A, Pureza MA, Al-Jahdali H, Bahammam AS, et al. Th17 cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils. *Respir Res.* 2013;14:34.

231. Obana M, Maeda M, Takeda K, Hayama A, Mohri T, Yamashita T, et al. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation.* 2010;121(5):684-91.

232. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med.* 2003;198(7):977-85.

233. Ates AH, Arslan U, Aksakal A, Yanik A, Ozdemir M, Kul S. Plasma Chemerin Levels Are Increased in ST Elevation Myocardial Infarction Patients with High Thrombus Burden. *Cardiol Res Pract.* 2018;2018:5812704.

234. Ji Q, Lin Y, Liang Z, Yu K, Liu Y, Fang Z, et al. Chemerin is a novel biomarker of acute coronary syndrome but not of stable angina pectoris. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:145.

235. Szentes V, Gazdag M, Szokodi I, Dezsı CA. The Role of CXCR3 and Associated Chemokines in the Development of Atherosclerosis and During Myocardial Infarction. *Front Immunol.* 2018;9:1932.
236. Dajotoy T, Andersson P, Bjartell A, Lofdahl CG, Tapper H, Egesten A. Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon stimulation with IFN-gamma. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):685-91.
237. Toor ISR, D; Thomson, A.; Felton, J.; Rossi, A.; Allen, J; Gray, G.A. Abstract 15551: Eosinophils Mediate Alternative Activation of Macrophages via IL-4 in the Infarcted Adult Mouse Heart to Prevent Adverse Cardiac Remodelling. *Circulation* 2018;Vol 134(Issue suppl_1).
238. Toor ISR, D.; Mair, I.; Ainsworth, R.; Meloni, M.; Spiroski, A-M.; Benezech, C.; Felton, J. M., Thomson, A., Caporali, A.; Keeble, T.; Tang, K. H.; Rossi, A. G.; Newby, D. E.; Allen, J. E.; Gray, G. A. . Eosinophil deficiency promotes aberrant repair and adverse remodelling following acute myocardial infarction. *BioRxiv.* 2019.
239. Toor IS, Jaumdally R, Lip GY, Millane T, Varma C. Eosinophil count predicts mortality following percutaneous coronary intervention. *Thromb Res.* 2012;130(4):607-11.
240. Heusch G. Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circ Res.* 2017;120(9):1477-86.

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Phasen der Infarkttheilung	7
Abbildung 2: Lokale und systemische Anpassungsvorgänge infolge eines Myokardinfarkts	10
Abbildung 3: Funktion von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten im Verlauf der Infarkttheilung	13
Abbildung 4: Aufbau eosinophiler Granulozyten	17
Abbildung 5: Eosinophile und ihre Interaktion mit anderen Immunzellen.....	24
Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der zirkulierenden Eosinophilen während Ischämie und Reperfusion in STEMI-Patienten und im Schweinemodell	30
Abbildung 7: Übersicht über die verwendeten Methoden	33
Abbildung 8: Antikörper, Konzentrationen und Inkubationszeiten	47
Abbildung 9: Prinzip des Zytokinarrays	51
Abbildung 10: Exemplarische Radiographie-Folie einer Balb/c Maus	52
Abbildung 11: Visualisierung der angewandten Gating-Strategie	56
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Schichtung nach der Zentrifugation	58
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Makrophagen-Polarisation	63
Abbildung 14: Übersicht angewandter statistischer Tests	68
Abbildung 15: Epifluoreszenzaufnahme eines Horizontalschnitts eines Herzes Tag 6 nach Infarkt (A) mit Vergrößerung des Infarktgebietes (B).....	69
Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Zellinfiltration im Infarktgebiet	70
Abbildung 17: Immunhistologische Quantifizierung der einwandernden Eosinophilen im steady state, an Tag 2, 6 und 30 nach Infarktinduktion in C57BL/6-Mäusen	71
Abbildung 18: Totales Perfusionsdefizit Tag 6 und Tag 30 nach Ischämie- Reperfusionsschaden	72
Abbildung 19: LVEF Tag 6 und Tag 30 nach Ischämie-Reperfusionsschaden....	73
Abbildung 20: LVEDV Tag 6 und Tag 30 nach Ischämie-Reperfusionsschaden sowie (A) und Δ LVEDV (B)	74
Abbildung 21: LVMV an Tag 6 und Tag 30 nach Ischämie-Reperfusionsschaden	76
Abbildung 22: Repräsentative horizontale Übersichtaufnahmen eines WT-	

Herzens (links) und eines Δ dblGATA1-Herzens (rechts) Tag 30 post Infarkt.....	77
Abbildung 23: prozentuale Fibrosefläche in Ebene 3 (A) und Ebene 2+3 (B).....	78
Abbildung 24: Repräsentative Aufnahmen aus dem Infarktgebiet Tag 30 einer Balb/c WT-Maus und einer Δ dblGATA1-Knockout-Maus	79
Abbildung 25: Quantitative Analyse der CD68 ⁺ -Zellen im Infarkt und Perinfarktbereich d30	80
Abbildung 26: Quantifizierung der Gefäßdichte im Perinfarktbereich	81
Abbildung 27: Repräsentative Aufnahmen des Perinfarktbereichs an Tag 30 zur Darstellung der Kapillardichte, Wildtyp (A), Knockout (B).....	81
Abbildung 28: Eosinophile im Blut im steady state, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion	84
Abbildung 29: Eosinophile im Herzen im steady state und Tag 2 nach Infarktinduktion	85
Abbildung 30: Neutrophile im Blut im steady state, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion	86
Abbildung 31: Neutrophile im Herzen im steady state und Tag 2 nach Infarktinduktion	87
Abbildung 32: Monozyten im Blut im steady state, Tag 2 und Tag 6 nach Infarktinduktion	88
Abbildung 33: Makrophagen im Herzen im steady state und an Tag 2 nach Infarktinduktion	89
Abbildung 34: Ly6C-Expression Tag 2 nach Infarktinduktion	90
Abbildung 35: Exemplarische FACS-Histogramme der CD80 und CD86 Expression von Makrophagen abhängig von Eosinophilen	91
Abbildung 36: Exemplarische FACS- Histogramme der CD163 und CD206 Expression	92
Abbildung 37: Ergebnisse IL-5 ELISA in Balb/c Mäusen im steady state, Tag 2 und Tag 6 nach Infarkt (A), Vergleich zur Δ dblGATA1-Knockout-Gruppe im steady state und an Tag 2 (B)	93
Abbildung 38: Ergebnisse Eotaxin-1 ELISA in Balb/c Mäusen im steady state, Tag 2 und Tag 6 nach Infarkt (A), Vergleich zur Gata1 Knockout-Gruppe an Tag 2 und Tag 6 (B).....	94

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper in Blut und Herz	54
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper	64
Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse aus PET und Histologie	82
Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Zytokine mit einem signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Gruppe	83

XII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ASS	Acetylsalicylsäure
BNP	Natriuretisches Peptid B
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CCL	CC-Chemokinligand
CD	Cluster of differentiation
CLC/Gal10	Charcot-Lexden Crystal Protein/Galectin-10
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
CX3CR1	CX3C Chemokinrezeptor 1
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
d	Tag(e)
DAMPS	danger-assoziierte molekulare Muster
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAM	Experimentelle Autoimmunmyokarditis
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECP	Eosinophiles Kationisches Protein
EDN	Eosinophil-derived Neurotoxin
EET	Eosinophile extrazelluläre Traps
EGPA	Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
EKG	Elektrokardiographie
EPX	Eosinophile Peroxidase
et al.	et alii
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
G	Gauche
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde(n)
HES	Hypereosinophiles Syndrom
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit

KO	Knock-out
l	Liter
LAD	Left anterior descending artery
LPS	Lipopolysaccharide
LVEDV	Linksventrikuläres Enddiastolisches Volumen
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVMV	Linksventrikuläres Metabolisches Volumen
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex
m	Meter
MACE	Major adverse cardiovascular events
MBP	Major basic protein
M-CSF	Monozyten-koloniestimulierender Faktor
mg	Milligramm
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Metalloproteinase
MPS	Monozytäres Phagozytose-System
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
OP	Operation
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMPS	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCI	Perkutane Koronarintervention
PET	Positron-Emissions-Tomographie
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
sec	Sekunde(n)
SS	steady state
SSC	Side Scatter
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIMPS	Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TPD	Totales Perfusionsdefizit
VAA	Vollständig antagonistisierbare Anästhesie
VEGF	Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor
WGA	Wheat germ Agglutinin
WT	Wildtyp
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung

XIII. LEBENSLAUF

Persönliche Angaben

Name:	Niklas Bürgener
Geboren:	30.05.1992 in Adenau
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Dr. Gunther Bürgener Dr. Sabine Bürgener
Geschwister:	Jan Bürgener Felix Bürgener

Ausbildung und Studium

02/2018 - 10/2019	experimentelle Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der Universität München, Großhadern
04/2018	Approbation als Tierarzt
10/2017 - 03/2018	Prüfungen 3. Staatsexamen, Abschlussnote: 1,86
09/2014 - 01/2015	Erasmus+ - Semester an der Universidad de Zaragoza, Spanien
09/2014	Physikum, Durchschnittsnote: 2,2
10/2012 - 03/2018	Studium der Tiermedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2002 - 03/2011	Thomas-Morus-Gymnasium Daun, Abiturnote: 1,8

XIV. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg und Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz für die Möglichkeit bedanken, in dieser Arbeitsgruppe forschen zu dürfen.

Besonders bedanken möchte ich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. vet. Sven Reese für die statistische Beratung sowie die Übernahme, die Durchsicht und Einreichung dieser Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Konstantin Stark und Dr. med. Tobias Weinberger für die Betreuung und Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Bei allen Mitgliedern der AG Massberg möchte ich mich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Dr. med. vet. Vanessa Schneider für die Hilfe bei den *in vivo* Versuchen und Michael Lorenz für die methodische Beratung und das Korrekturlesen. Sara Elhag möchte ich für die Einarbeitung und die Hilfe bei den *in vitro* Experimenten danken. Außerdem möchte ich meinen fleißigen Korrekturlesern Leonard Glück, Denise Messerer, Eva Marie Famira-Parcsetich und Dr. med. vet. Annegret Boda danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner großartigen Familie, die mir immer den Rücken gestärkt und mich immer unterstützt hat. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern dafür, dass sie mich mit ihrer Begeisterung für den Beruf des Tierarztes angesteckt haben. Besonderer Dank gilt auch meinen Großeltern für die Unterstützung und die vielen intensiven Gespräche.

Ebenso möchte ich meinen Freunden danken, besonders Leonard Glück, Sirkka Mang, Eva Daldrup, Pina Geißler, Farina Kerneck und Kerstin Ackermann, die das Studium und die Zeit in München so großartig gemacht haben.

Großer Dank gilt auch meinem Partner Kai Güntner für seine Unterstützung, Geduld und seine positive Art.